

## **Analyse phMRI des variations dose-dépendantes du signal BOLD, suite à une injection aiguë de cocaïne chez la souris femelle C57BL/6**

**Auteur :** Bruneel, Jérôme

**Promoteur(s) :** Tirelli, Ezio; Plenevaux, Alain

**Faculté :** Faculté de Psychologie, Logopédie et Sciences de l'Éducation

**Diplôme :** Master en sciences psychologiques, à finalité spécialisée en neuroscience cognitive et comportement

**Année académique :** 2017-2018

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/6013>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

*Analyse phMRI des variations dose-  
dépendantes du signal BOLD, suite à une  
injection aigue de cocaïne chez la souris  
femelle C57BL/6*

**Mémoire présenté par Jerome Bruneel  
en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Psychologiques**

**Sous la direction du Professeur Ezio Tirelli et du Professeur Alain Plenevaux**

**Lecteurs : Pr. Etienne Quertemont et Pr. André Ferrara**

**Année Académique 2017-2018**



## **Remerciements**

Je souhaite tout d'abord remercier l'équipe du Laboratoire Préclinique du Centre de Recherche du Cyclotron pour m'avoir accueilli en leur sein. Merci à Alain, Mohammed, Guillaume et Melissa pour leur aide et leurs précieux conseils, pour m'avoir épaulé dans la réalisation de ce mémoire.

Merci également au Professeurs Ezio Tirelli et Alain Plenevaux d'avoir accepté de chapeauter ce travail.

Finalement, merci à ma famille pour leur amour et leur soutien inconditionnel.



# Table des Matières

<b>Chapitre 1 - Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 2 – Revue de la littérature</b> .....	<b>3</b>
Cocaine – Généralités .....	5
Cocaine – Les effets sur le corps et la conscience .....	7
Cocaine et système nerveux central .....	8
L’IRM pharmacologique .....	10
Les défis de l’IRM pharmacologique .....	13
Etude IRMf de l’action de la cocaïne sur le SNC .....	15
<b>Chapitre 3 – Matériel et Méthode</b> .....	<b>19</b>
Description générale du plan expérimental .....	21
Animaux.....	22
Administration de cocaïne.....	23
Anesthésie .....	24
Acquisitions IRM .....	25
Traitement des données – Prétraitement.....	26
Traitement des données – Analyses statistiques .....	31
<b>Chapitre 4 – Présentation des résultat</b> .....	<b>33</b>
Anesthésie et stabilité des fonctions physiologiques .....	35
Qualité de l’acquisition IRMf .....	35
Prétraitement des images .....	37
Résultats des analyses statistiques .....	41
<b>Chapitre 5 – Interprétation et discussion</b> .....	<b>47</b>
Anesthésie et stabilité des fonctions physiologiques .....	49

Qualité de l'acquisition IRMf .....	49
Prétraitement des images .....	51
Résultats des analyses statistiques .....	51
<b>Chapitre 6 – Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>55</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>59</b>

# **Introduction**



Depuis les années 1910, la cocaïne est reconnue comme un danger public de par ses aspects hautement addictifs et toxiques, sans compter qu'elle est aujourd'hui la deuxième drogue la plus représentée sur le marché belge. Si bien qu'elle concernait en 2014, 16% des demandes de traitement pour addiction (Rapport national sur les drogues, 2014). Surtout utilisée pour sa capacité à induire un sentiment de plaisir intense et à augmenter les capacités exécutives et énergétiques, elle est également connue pour provoquer une dépendance psychologique rapide et puissante, ainsi que des complications à long-terme, notamment cardiaques (Shanti & Lucas, 2003). Ainsi, comme pour toutes les autres drogues, une attention toute particulière est accordée aux projets de recherche la concernant.

Si de multiples chercheurs se sont déjà attelés à caractériser ses effets sur le comportement et le fonctionnement neuronal, la majorité des études récentes tentent de caractériser et expliquer le phénomène d'addiction (Meyer & Quenzer, 2005). Malgré tout, il reste encore difficile à ce jour d'avoir une vision globale précise de ses effets aigus sur le fonctionnement cérébral. Bien que l'on ait connaissance de ses cibles pharmacologiques et de ses effets sur le système nerveux central, certains aspects de sa pharmacodynamique restent encore très obscurs. C'est par exemple le cas de son effet dose-dépendant. Si un tel effet a été démontré dans les modèles animaux comportementaux (Michel & Tirelli, 2002 ; Borges, Duarte, Nogueira & Barros, 2015), très peu d'études se sont déjà intéressées à ses corrélats neurofonctionnels.

Néanmoins, l'arrivée des techniques d'imagerie modernes, notamment la tomographie par émission de positons et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) ouvrent la porte d'un tout nouveau champ d'exploration. En effet, ces dernières permettent l'observation in vivo de l'action pharmacologique des drogues sur le cerveau (Jonckers, Shah, Hamaide, Verhoye & Van der Linden, 2015). Malheureusement, ces techniques sont difficiles à mettre en place et nécessitent une méthodologie expérimentale et statistique rigoureuse.

Actuellement, le Centre de Recherche du Cyclotron, département affilié à l'Université de Liège, cherche à débiter un projet de recherche investiguant les corrélats neurofonctionnels de l'addiction à la cocaïne. Si l'infrastructure pour une telle étude est déjà disponible, aucune recherche n'a encore été effectuée sur ce sujet en IRMf. Par conséquent, il est nécessaire de développer une méthode d'étude d'un tel effet. C'est précisément à cette fin que ce sujet de mémoire a été proposé. Il s'agit ici de développer de tester un protocole expérimental permettant

l'acquisition et l'analyse du signal BOLD successif à l'administration de cocaïne chez la souris. Il va sans dire que le protocole devra également être testé en situation expérimentale réelle afin de s'assurer de sa faisabilité. Ainsi, nous allons tester les effets de quatre doses différentes de cocaïne (0, 4, 8 ou 12 mg/kg) sur le signal BOLD cérébral.

Le manuscrit suivant s'agencera en quatre parties. Premièrement, un bref état de la littérature sera fait, introduisant la méthodologie et amenant progressivement à la formulation des hypothèses de travail. Ensuite, le plan expérimental sera présenté et justifié. Finalement, les résultats seront présentés et discutés.

# **Revue de la littérature**



## Cocaïne – Généralités

La cocaïne est une substance naturelle, issue des feuilles d'une plante principalement trouvée en Amérique Centrale et du Sud, l'*Erythoxylum coca*. Cette plante est initialement connue pour avoir été utilisée par les peuplades sud-américaines, notamment comme anesthésiant local. A l'arrivée des Espagnols en Amérique du Sud, la substance a été détournée par les colons afin d'asservir les foules. En effet, elle permettait de rendre le travail des mineurs d'argent moins harassant. Il s'agit de la première utilisation endémique de la cocaïne et tant que substance psychoactive. Ce n'est que dans les années 1800 que la cocaïne a de nouveau été utilisée comme substance anesthésiante, après qu'un scientifique allemand ait réussi à extraire les composés alcaloïdes de la feuille de coca.

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et au début du 20<sup>ème</sup>, les alcaloïdes furent largement incorporés à diverses substances, afin de faire profiter aux gens de ses caractéristiques psychoactives. Entre autres, elle était intégrée à des boissons, la plus célèbre étant le Coca Cola, et autres produits du quotidien, comme du dentifrice ou des chewing-gums. Par ailleurs, certains l'ajoutaient dans des breuvages alcoolisés, afin d'en renforcer les effets stimulants, pratique que l'on retrouve encore aujourd'hui. Ce n'est qu'à partir des années 1910 que l'aspect toxicomanogène de la cocaïne a commencé à être reconnu par les gouvernement mondiaux. L'année 1914 marque la promulgation du 'Harrison Act' aux Etats-Unis d'Amérique, une loi règlementant son usage. Peu à peu, sa distribution a été réduite jusqu'à la rendre illégale (Goldstein, DesLauriers & Burda, 2009).

Au jour d'aujourd'hui, la cocaïne est officiellement reconnue comme illégale partout en Europe. Néanmoins, comme toute substance toxicomanogène, elle continue à être consommée par une minorité. L'Observatoire Européen de Drogues et Toxicomanies (OEDT) estime qu'il s'agit de la substance stimulante illicite la plus consommée en Europe. En 2015, elle représente 9% des saisies, occupant ainsi la seconde position, après le cannabis. Sa valeur du marché est estimée à environ 6 milliards d'euros.

En 2017, 5,2% des adultes âgés de 15 à 64 ans l'auraient déjà essayée au moins une fois dans leur vie. En règle générale, cette tendance se maintient depuis le début des années 2000 (*Fig. 1*). En 2015, le taux d'usage problématique était estimé à environ 0,20% (OEDT, 2017).

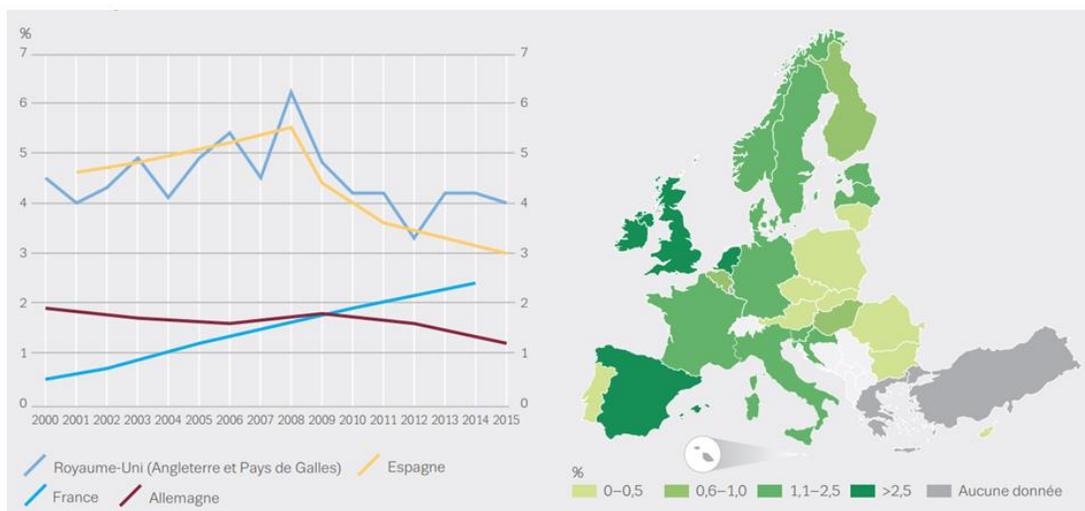


Fig. 1 - Prévalence de la consommation de cocaïne dans les différents pays d'Europe, chez les jeunes de 15 à 35 ans. A gauche : l'évolution au cours des 15 dernières années. A droite : la prévalence par pays, en 2017 (OEDT, 2017).

Comme expliqué ci-dessus, la cocaïne provient principalement d'Amérique du Sud où sont cultivées des plantations d'*Erythroxylon coca*. Le processus de raffinage est assez simple. Tout d'abord, les feuilles sont laissées à tremper dans du kérosène, jusqu'à obtenir une pâte épaisse. Ensuite, elles sont retirées et la pâte est transformée en poudre à l'aide d'acide chlorhydrique, afin d'obtenir du chlorhydrate de cocaïne, une substance soluble dans l'eau. Celle-ci peut alors être utilisée telle quelle ou transformée en 'Freebase' ou en 'Crack'. Le premier est un composé volatil obtenu par dissolution dans de l'éther puis évaporation. Le second est synthétisé en dissolvant la poudre dans de l'eau puis en la mixant avec du bicarbonate de sodium et en la chauffant pour obtenir des cristaux solides (Shanti & Lucas, 2003).

La consommation de cocaïne se fait de différentes manières. La plus connue consiste à répartir la poudre en ligne et à l'aspirer par le nez. Ceci permet une absorption directe par les muqueuses nasales. Une seconde méthode consiste à la fumer. Pour cela, des cristaux (freebase ou crack) sont placés au fond d'un tube de verre, puis chauffés jusqu'à évaporation. L'absorption se fait ici par les muqueuses pulmonaires. Selon Goldstein et al. (2009), il s'agit de la voie la plus communément utilisée. Finalement, il arrive qu'elle soit diluée dans de l'eau et injectée directement en voie intramusculaire ou intraveineuse. Selon la voie d'administration, les effets se

font ressentir plus ou moins vite (8 secondes quand la cocaïne est fumée) et longtemps (jusqu'à 6h, pour la voie intranasale) (Shanti & Lucas, 2003).

## Cocaïne – Les effets sur le corps et la conscience

Les effets de la cocaïne peuvent se répartir en deux catégories : les effets à court terme, ou aigus, et ceux à long-terme, chroniques. Ils sont aussi bien physiologiques que cognitifs.

La cocaïne est un bloqueur de la recapture des catécholamines, entre autres de l'adrénaline et de la noradrénaline, deux acteurs principaux du système sympathique. La prise de cette substance induit donc une augmentation de l'activation globale du dit système, provoquant ainsi de nombreux changements physiologiques : tachycardie, hypertension, agitation motrice, hyperthermie... En outre, elle provoque également une série de modifications cognitives. Tout d'abord, un bref effet de plaisir intense, aussi appelé 'rush' est expérimenté . Celui-ci est ensuite suivi d'un effet 'high', un sentiment d'euphorie, couplé à une augmentation de l'attention, de l'énergie et de la confiance en soi (Meyer & Quenzer, 2005)

A fortes doses, des complications peuvent survenir. Par exemple, l'accumulation massive de sérotonine dans le cerveau peut provoquer des crises d'épilepsie. D'autres risques couramment rencontrés sont des complications cardiaques telles thromboses et hémorragies, des œdèmes pulmonaires, de l'anxiété, des crises de délire, de la paranoïa... (Shanti & Lucas, 2003 ; Warner, 1993). Une augmentation des comportements agressifs peut aussi être observée.

Précisons également que le choix de la voie d'administration influence inévitablement les effets aigus de la substance (*Fig. 2*).

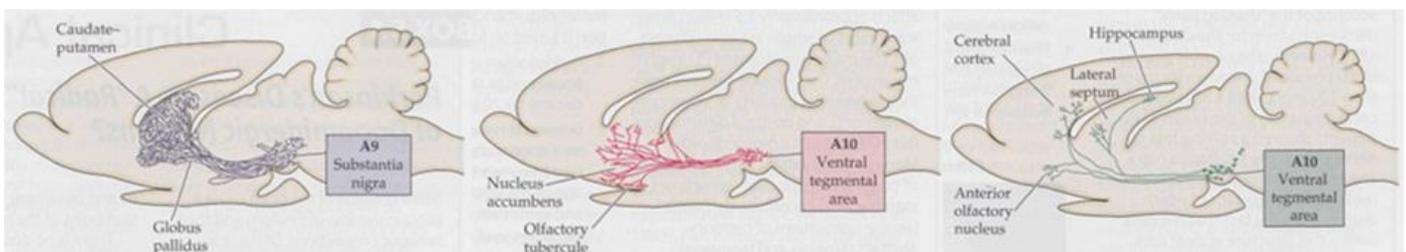
Variable	Route		
	Intravenous (0.6 mg/kg)	Smoked (0.4 mg/kg)	Nasal (2 mg/kg)
Pulse increase, <i>beats/min</i>	46	32	26
Systolic blood pressure increase, <i>mm Hg</i>	28	32	24
Diastolic blood pressure increase, <i>mm Hg</i>	16	22	11
Subjective "high," <i>1 to 100 points</i>	48	35	18

*Fig. 2* – Tableau représentant quelques effets différentiels de la cocaïne, liés à la route d'administration (Warner, 1993).

En plus de son aspect addictif, la cocaïne peut provoquer des déficits dans les fonctions cognitives lorsqu'elle est consommée de manière chronique. Par exemple, des problèmes d'attention, d'impulsivité, d'apprentissage ou de mémoire peuvent être observés chez les consommateurs à long terme (Spronk, van Wel, Ramaekers & Verkes, 2013 ; Potvin, Stavro, Rizkallah & Pelletier, 2014).

## Cocaïne et système nerveux central

Comme mentionné précédemment, la cocaïne est une substance bloquant la recapture de trois neurotransmetteurs monoaminergiques : la dopamine, la norépinephrine et la sérotonine. Celui-ci se fait par établissement d'une liaison inactivant la protéine transmembranaire présynaptique permettant la recapture du neurotransmetteur, provoquant ainsi une augmentation de la concentration en neurotransmetteurs dans la fente synaptique. C'est ainsi que la cocaïne agit sur trois grands systèmes du système nerveux central (SNC) (*Fig. 3*) (Meyer & Quenzer, 2005).



*Fig. 3* – Schéma représentant les différents circuits dopaminergiques. De gauche à droite : nigrostrial, mésolimbique et mésocortical (Meyer & Quenzer, 2005).

Le système cible le plus connu est l'ensemble des réseaux dopaminergiques, qui sont au nombre de trois : le mésolimbique, le mésocortical et le nigrostrial. Le premier, plus largement référencé est aussi connu sous le nom de 'circuit de la récompense'. Il est constitué de l'ensemble des régions soumises aux afférences dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV), dont les noyaux accumbens, l'amygdale ou encore l'hippocampe et les régions olfactives. Comme son nom le suggère, ce réseau est responsable de la motivation comportementale et de l'apprentissage par renforcement. L'action de la cocaïne sur ces régions serait responsable de l'établissement du phénomène d'addiction psychologique (Berridge & Robinson, 2016 ; Salamone & Correa, 2012). Le second prend aussi racine dans l'ATV, mais projette dans les régions préfrontales, responsables de la gestion des fonctions exécutives. Le dernier concerne, quant à lui, les régions striatales stimulées par les axones provenant de la substance noire. Ce réseau agit comme modulateur de la fonction motrice. Dans le cadre de la consommation de cocaïne, celui-ci serait en grande partie responsable des altérations locomotrices successives à une consommation aiguë (Meyer & Quenzer, 2005).

Principalement régulé par la norépinephrine, le système sympathique est également pris pour cible par la cocaïne. Celui-ci ayant pour fonction de préparer le corps humain à l'action, il régule toute une série de fonctions physiologiques telles que la fréquence et pression cardiaque ou l'attention. L'action de notre drogue sur ce système est notamment responsable des variations vasculaires mentionnées précédemment (Meyer & Quenzer, 2005).

Finalement, la sérotonine est, quant à elle, est largement représentée dans l'ensemble du cerveau, avec des concentrations plus importantes dans les aires corticales dopaminergiques (Howell & Cunningham, 2015). Selon des études effectuées sur des souris knock-out, elle serait impliquée dans le développement de l'addiction psychologique, au même titre que la dopamine (Sora et al., 2001). A doses importantes, il pourrait être également responsable des symptômes psychotiques aigus observables chez les consommateurs de cocaïne.

## L'IRM pharmacologique

L'arrivée des techniques modernes d'imagerie, notamment de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) offre l'opportunité de visualiser In Vivo l'action de la cocaïne sur le fonctionnement cérébral. De telles études sont référencées sous l'appellation 'phMRI', c'est-à-dire 'Imagerie par résonance magnétique pharmacologique'. Il s'agit d'une sous-catégorie de l'IRMf, visant à quantifier la réaction hémodynamique cérébrale successive à l'injection d'un agent chimique (Jenkins, 2012). La réaction hémodynamique définit le phénomène d'adaptation du flux sanguin, suite à une modification dans le système. La méthode IRM part du postulat que ces adaptations peuvent être utilisées comme mesures indirectes de modifications de l'activité cérébrale.

Trois types de mesures de la réaction hémodynamique sont couramment utilisées : la mesure des changements du flux sanguin cérébral (CBF), la mesure des changements en volume sanguin cérébral (CBV) et la mesure des changements en proportions d'oxyhémoglobine (BOLD). Si toutes tendent à mesurer le même effet, seule la troisième fera l'objet d'une observation dans la cadre de la présente étude.

Afin de mieux appréhender les résultats présentés dans le cadre de cette étude, il est impératif de comprendre comment fonctionne un scanner IRM mais également la manière dont il construit ses images.

Le principe de base de l'IRM repose sur la théorie du 'magnétisme nucléaire'. Celle-ci prend sa source dans les paradigmes du magnétisme, admettant que tout élément chargé tournant sur lui-même produit un champ magnétique aligné sur son axe de rotation. Cette résultante est aussi appelée 'Moment Magnétique'. Or, il se trouve qu'un tel phénomène se produit spontanément dans toute matière organique. En effet, toute molécule est animée d'un mouvement rotatif appelé 'spin' qui, dans le cas très précis de certaines molécules telles que l'hydrogène, est accompagné d'un moment magnétique (*Fig. 4*). Ainsi, tout tissu composé partiellement d'atomes d'hydrogène comporte un champ magnétique propre. Lorsqu'ils sont soumis à des conditions environnementales normales, tous les moments magnétiques individuels sont orientés de manière aléatoire et le vecteur de champ magnétique global des tissus pour être considéré comme nul.

Néanmoins, s'ils sont soumis à un champ magnétique de magnitude supérieure, tous les atomes vont s'orienter dans la même direction que ce dernier. C'est précisément ce phénomène que l'imagerie par résonance magnétique exploite (Kastler & Vetter, 2018).

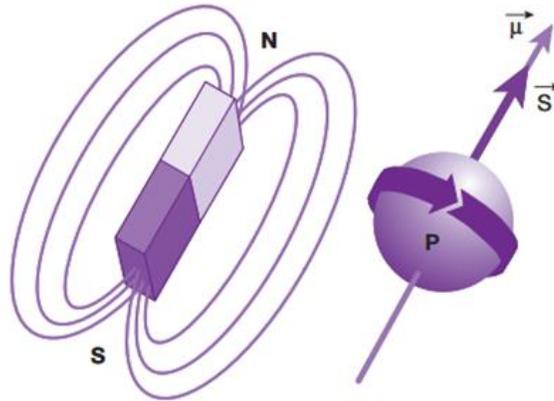


Fig. 4 – Représentation schématique du moment magnétique  $\mu$  provoqué par la rotation d'un atome chargé (Kastler & Vetter, 2018).

Si l'on devait vulgariser à l'excès, un scanner IRM pourrait être caractérisé de 'gros aimant'. Chacun est muni d'une bobine supraconductrice dans laquelle est injecté un courant électrique de plusieurs tesla afin de créer un champ magnétique puissant orienté dans le sens de la machine. Ainsi, lorsqu'un individu est placé dedans, tous les vecteurs d'aimantation des molécules d'hydrogène se réorientent parallèlement à celui-ci. Mais la force magnétique émise par les atomes présente également une composante transversale provoquée par la rotation des atomes (Fig. 5). Sous des conditions normales, cette composante est nulle dans un tissu étant donné que les atomes tournent de manière désynchronisée. Néanmoins, les scanners sont capables de générer des ondes de radiofréquence parallèles au champ magnétique principal, permettant la synchronisation des fréquences de rotation. De plus, elle permet de faire entrer en résonance ces fréquences afin d'augmenter le niveau d'énergie de la composante transversale, ce qui produit une réorientation du champ magnétique résultant. Lorsque la génération d'ondes de radiofréquence est cessée, l'énergie gagnée est resituée, les rotations se désynchronisent à nouveau et le champ magnétique résultant redevient parallèle à celui du scanner. Ce retour à la normale, aussi appelé 'phénomène de relaxation' se fait de manière progressive et est capté et

analysé lors du processus IRM. L'appellation 'T1', largement utilisée dans le milieu fait référence à la 'relaxation longitudinale', c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la magnétisation revienne à 63% de son niveau initial. A l'inverse, le 'T2' ou 'relaxation transversale' correspond à la perte de 63% de la composante transversale (Kastler & Vetter, 2018). Il est important de noter que ces temps de relaxation varient pour chaque type de tissus, ce qui permet à terme d'obtenir une carte rendant compte des répartitions tissulaires dans un organe. Les séquences d'acquisition IRM sont spécialement conçues pour refléter préférentiellement l'un ou l'autre contraste (T1 ou T2).

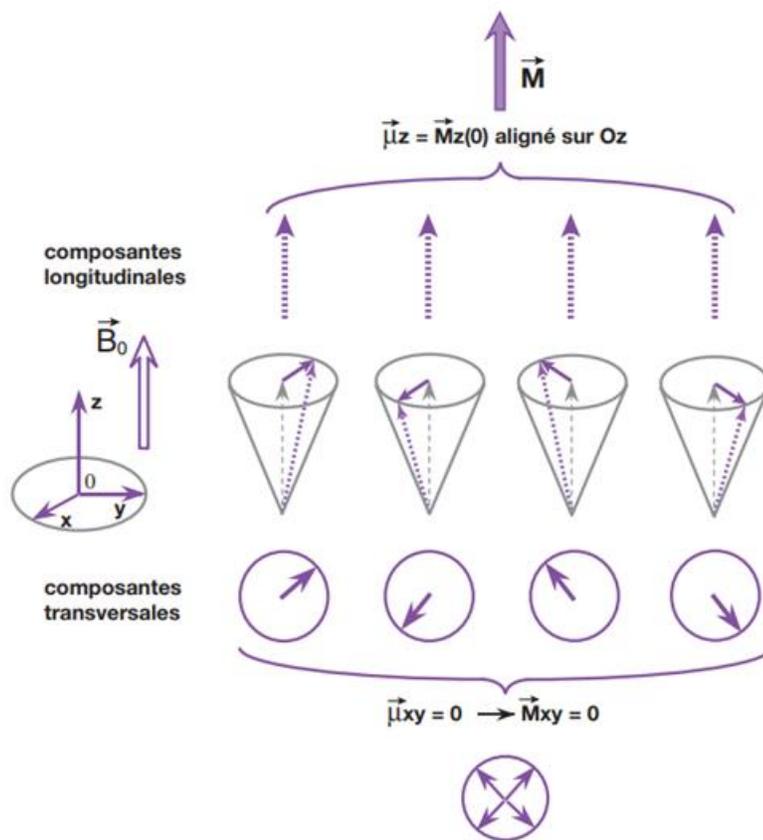


Fig. 5 – Représentation schématique des composantes longitudinales ( $M_z$ ) et transversales ( $M_{xy}$ ) provoquées pas la rotation d'un atome d'hydrogène sur lui-même (Kastler & Vetter, 2018).

Dans le cadre de l'IRMf, le signal acquis est légèrement différent et appelé T2\*, qui représente la combinaison du signal T2 et des inhomogénéités de champ, de petits champs magnétiques moléculaires locaux ou de petits 'défauts' dans le champ magnétique du scanner. Par définition, ce signal est donc plus sensible aux perturbations du champ magnétique. Or, c'est précisément ce qui nous intéresse dans le cadre d'études fonctionnelles. En effet, celles-ci partent d'un postulat simple. Elle admet qu'une augmentation d'activité neuronale est couplée à une augmentation locale des concentrations en sang oxygéné dans les capillaires.

Ceci s'explique très simplement. Lorsqu'un neurone s'active, il consomme de l'adénosine triphosphate (ATP), un 'carburant cellulaire' synthétisé sur place par glycolyse, un processus consommant de l'oxygène. La consommation de ce dernier induisant une déplétion des réserves locales en oxygène, une série de processus de régulation se mettent en place pour les restaurer, dont une arrivée massive de sang oxygéné. Cette arrivée massive va provoquer une perturbation locale du champ magnétique, liée à la faible susceptibilité magnétique de celui-ci. Ces perturbations vont entraîner une modification du signal T2\*, aussi appelée 'signal BOLD' (Glover, 2011).

Il est important de mentionner que ces variations constituent une observation indirecte de l'activité cérébrale. L'entièreté de la méthode repose sur l'hypothèse de véracité du paradigme de base.

## **Les défis de l'IRM pharmacologique**

Lorsque l'on analyse la littérature concernant l'IRM pharmacologique sur rongeurs, on s'aperçoit que tous les auteurs s'accordent sur les nombreux challenges rencontrés lors de telles études (Febo, 2011 ; Febo, 2013 ; Haensel, Spain & Martin, 2014 ; Pan, Billings, Grooms, Shakil & Keilholz, 2015 ; Jonckers, Shah, Hamaide, Verhoye & Van der Linden, 2015 ; Jenkins, 2012).

Le premier défi rencontré est évidemment la taille du sujet étudié. En effet, le cerveau d'une souris mesure moins de trois centimètres de longueur, ce qui représente moins de 10% de la taille du cerveau humain. Il s'avère donc difficile d'obtenir une bonne résolution d'acquisition avec les

scanners communs. C'est pourquoi l'utilisation de scanners à hauts champs magnétiques (9.4/11.7T) est vivement conseillée dans ce cadre (Febo, 2013).

Toujours en comparaison avec les études humaines, la seconde difficulté vient du fait que les souris n'ont pas conscience de la situation dans laquelle elles se trouvent lors des acquisitions IRM. En effet, si les humains participent volontairement aux expériences et en réalisent les enjeux, ce n'est pas le cas des animaux. Ceux-ci sont placés de force dans un environnement extrêmement bruyant. Elles subissent ainsi énormément de stress et adoptent des comportements de fuite. Il est donc nécessaire de les immobiliser à l'intérieur du scanner, afin de pouvoir les maintenir en place le temps d'une acquisition.

Malheureusement, la simple contention ne suffit pas à contrecarrer tous les effets du stress. De nombreuses études ont montré que celui-ci influence de manière directe le signal BOLD obtenu. Deux solutions existent alors. Premièrement, entraîner les animaux à supporter les conditions de scan, à l'aide de méthodes de conditionnement et d'habituation. Les études à ce sujet sont mitigées, mais se montrent optimistes. Malheureusement, dans le cadre d'une étude pharmacologique, il est difficile d'utiliser une telle méthode, l'administration répétée de substance pouvant mener à une modification à long terme de ses effets (habituation, sensibilisation...).

Une seconde option consiste à anesthésier légèrement les sujets, afin de les rendre insensibles aux conditions expérimentales. Néanmoins, cette méthode apporte également son lot de complications. Premièrement, on peut observer une diminution de la température corporelle. Celle-ci est connue pour modifier la métabolisation du glucose et de l'oxygène, ce qui est assez contraignant lorsque l'on étudie des variations en concentration d'oxygène. Par conséquent, il est nécessaire d'équiper les scanners de systèmes chauffants et de contrôler la température. De plus, la plupart des anesthésiants modifient les phénomènes hémodynamiques et respiratoires. Ceci peut également perturber le signal BOLD acquis. Il est donc nécessaire de choisir avec soin un protocole d'anesthésie qui soit pratique d'un point de vue expérimental, mais qui minimise aussi les perturbations hémodynamiques et respiratoires (Haensel, Spain & Martin, 2014). Il est également obligatoire de contrôler constamment l'état de sédation de l'animal, afin d'éviter qu'un réveil inopiné ne vienne modifier l'activité cérébrale basale.

Un autre point mis en avant par les différents auteurs est l'attention à porter au cycle hormonal des animaux, celui-ci pouvant avoir un effet indésirable sur la réponse habituelle. Dans le cas de la cocaïne, par exemple, les concentrations en estradiol chez la femelle peuvent modifier les résultats obtenus (Haensel, Spain & Martin, 2014 ; Pan et al., 2015). Jonckers et al. (2015) insistent également sur l'importance de faire preuve de prudence lorsque l'on essaye de répliquer des études phMRI sur des individus d'une autre espèce, la métabolisation des substances pouvant différer selon les espèces.

Finalement, Febo (2011 ; 2013) précise également qu'il est important de traiter les données IRMf avec la plus grande rigueur. En effet, le processus d'acquisition comporte inévitablement toute une série de biais. Nous reviendrons plus en détail sur cet aspect par la suite.

## **Etude IRMf de l'action de la cocaïne sur le SNC**

Chez l'humain, de nombreuses études se sont déjà attelées à référencer l'effet d'une administration aiguë de cocaïne sur les variations du signal BOLD cérébral. Par exemple, Kufahl et al. (2005) ont démontré l'existence de ce phénomène dans plusieurs zones cérébrales. Ils ont observé une diminution significative du signal BOLD dans les aires associées au système mésolimbique (noyau accumbens, pallidum ventral, aire tegmentale ventrale, amygdale...) et dans les régions orbitofrontales. Ils ont également rapporté une augmentation dans les régions préfrontales (cortex préfrontal dorsolatéral, cortex insulaire, gyrus orbital inférieur et médian, cortex frontopolaire).

Chez le rongeur, la plupart des études IRM, sur la cocaïne, se sont concentrées sur l'observation des variations en CBV dans le système limbique. Ces études (Chen et al. 2011 ; Lu et al. 2012) ont reporté une augmentation systématique de celui-ci, suite à l'administration aiguë de cocaïne. Seules quelques études se sont intéressées aux variations de signal BOLD successives à l'administration de cocaïne. Marcelo Febo et son équipe, par exemple, ont largement étudié ce phénomène (Febo, 2013 ; Febo, 2011). Ce faisant, ils ont montré qu'une administration aiguë de cocaïne (20 µg), chez des rats males, provoque immédiatement une augmentation généralisée du

signal BOLD dans le système dopaminergique mésocorticolimbique, notamment dans le locus niger, l'aire tegmentale ventrale, les noyaux accumbens, le striatum dorsal et le cortex préfrontal (Febo et al., 2004). D'autres études ont corroboré ces résultats, en montrant également une réponse BOLD dans le cortex frontal agranulaire, le striatum ventrolatéral, le cortex somatosensoriel, le cortex auditif et le cortex visuel (Marota et al., 2000), ainsi que dans le cortex cingulaire et le thalamus (Marota et al., 2000 ; Luo, Wu, Li & Li, 2003), et dans l'hypothalamus et le noyau caudé du putamen (Luo et al., 2003).

Néanmoins, Taheri, Xun, See, Joseph et Segarra (2005) n'ont pas réussi à montrer un tel effet. Ils postulent que ceci pourrait être causé par la voie d'injection choisie (intraveineuse) et le fait que les acquisitions n'aient commencé que dix minutes après l'injection.

Seuls Febo, Ferris et Segarra (2005) ont effectué des études sur les rats femelles. Ils ont notamment montré que les femelles ovariectomisées et soumises à un traitement à l'estradiol présentent des variations en signal BOLD moindres, en comparaison à des femelles ovariectomisées non traitées à l'estradiol. Ceci pourrait suggérer une différence sexuelle de réactivité cérébrale à la cocaïne, médiée par les concentrations sanguines en estradiol.

Concernant un éventuel effet dose-dépendant de la cocaïne, sur le signal BOLD, Luo, et al. (2003) ont trouvé que l'administration de doses plus importantes de cocaïne menait à des variations plus importantes et plus longues de celui-ci. Ils ont également montré que l'augmentation en signal BOLD précédemment référencé dans les noyaux accumbens, le cortex préfrontal, l'hypothalamus, le cortex cingulaire, le cortex préfrontal, le thalamus et les noyaux caudé du putamen pourrait être précédée d'une diminution dose-dépendante très brève du signal BOLD dans ces régions.

Rappelons que toutes ces études ont été réalisées sur des rats. L'estimation des variations du signal IRMf suite à une injection aiguë de cocaïne n'a, à ma connaissance, été réalisée chez la souris que par un seul groupe de chercheur. En effet, Perles-Barbacaru et al. (2011) ont publié deux études faisant état de résultat d'études pHMRI des variations en CBV consécutives à l'administration d'un bolus de cocaïne. Ce faisant, ils rapportent une diminution généralisée tout au long du circuit de la récompense, avec une variation plus élevée que la moyenne pour les cortex et les noyaux accumbens. Un an plus tard, ils ont répliqué leurs résultats lors dans une seconde étude (Perles-Barbacaru et al., 2012).

Par conséquent, l'objectif de ce mémoire est double. Dans un premier temps, nous souhaitons mettre en place un protocole d'acquisition et d'analyse du signal BOLD, chez la souris sous injection aiguë de cocaïne. En effet, nous avons pu voir dans la littérature que ce genre d'étude n'a pas encore été réalisé. Cette mise en place représente un challenge, car elle s'impose toute une série de contraintes. Premièrement, elle implique l'utilisation d'un scanner à haut champ magnétique. Deuxièmement, il faut assurer un protocole d'anesthésie fiable et stable, affectant de manière minimale la fonction hémodynamique. Troisièmement, l'injection se fait intrascanner, ce qui implique la mise en place de toute une procédure de mise en place de cathéters et de pompes à injection.

Cette étude sert donc à déterminer s'il est possible, avec les moyens du laboratoire, de mettre en place une telle infrastructure. Nous espérons que la mise en place de ce protocole permettra d'obtenir une méthode d'acquisition fiable et ouvrira la voie à tout un projet d'étude visant à investiguer les corrélats neurofonctionnels de l'addiction à la cocaïne.

Le second objectif est de tester le protocole en situation expérimentale concrète. Il vise à répliquer les résultats observés dans la littérature lors d'une étude. Il s'agit, ici, de constater l'effet de différentes doses de cocaïne, sur l'activité BOLD cérébrale. Sur base de la littérature, une hypothèse a été formulée.

Nous nous attendons à observer une augmentation significative dose-dépendante de la variation en signal BOLD dans toutes les aires dopaminergiques mésocorticolimbiques, lorsqu'une souris est injectée avec de la cocaïne.



# **Matériel et méthode**



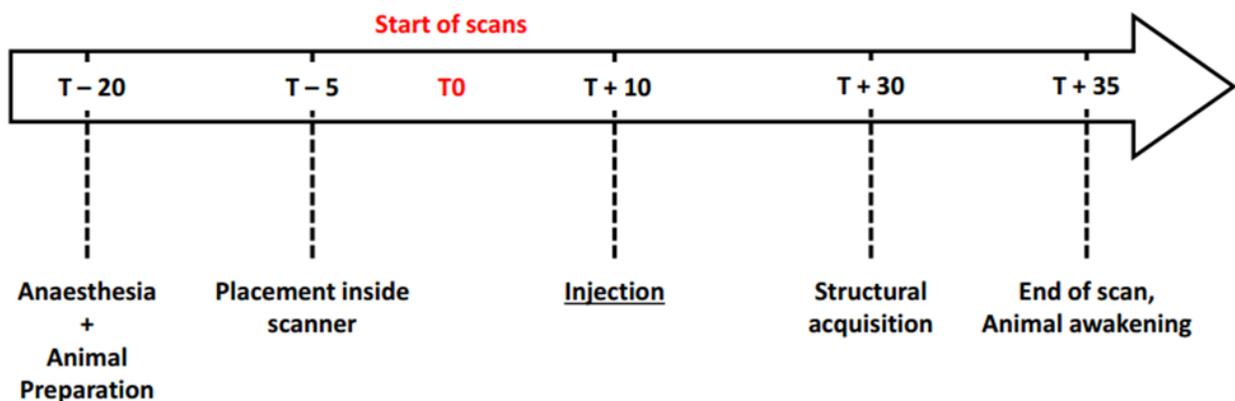
## Description générale du plan expérimental

Cette étude phMRI sur les effets dose-dépendants d'une injection aiguë de cocaïne, sur les variations en signal BOLD dans le cerveau des souris s'est déroulée de la manière suivante.

Les 16 souris constituant l'échantillon expérimental ont été réparties aléatoirement en quatre groupes, correspondants aux quatre conditions expérimentales d'administration de substance. Selon la condition, ces souris ont reçu soit une injection de cocaïne de 4, 8 ou 12 mg/kg, soit une injection de solution saline (groupe contrôle). Cette injection était faite in vivo, directement à l'intérieur du scanner IRM.

Les phases d'acquisition IRM se sont déroulées en quatre phases : 1) Anesthésie, cathétérisation et contention de l'animal ; 2) Lancement de la séquence d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (30 minutes) ; 3) 10 minutes après le début de la séquence, administration de la cocaïne par voie intrapéritonéale ; 4) Lancement d'une séquence d'acquisition structurale (*Fig 4*).

Ce qui aura permis d'obtenir trois choses : 10 minutes d'activité BOLD de base, correspondant aux 10 minutes de scan précédant l'injection de cocaïne ; 20 minutes de variation en activité BOLD, successives à l'administration ; une image structurale du cerveau de chacune des souris.



*Fig. 6* – Schéma représentant le déroulement d'une session d'acquisition. 20 min avant le début des scans, les animaux sont préparés et placés dans le scanner. La substance n'est injectée que 10 min après le début des acquisitions. Après 30 min, fin de la séquence IRMf et début d'une acquisition de 5 min. Temps total : +- 1h

Avant d'être analysées, les données ont été soumises à plusieurs prétraitements, visant deux objectifs distincts. Premièrement, plusieurs corrections sont apportées afin de supprimer certains défauts et artefacts liés aux acquisitions IRM (correction du mouvement, timing des tranches...). Deuxièmement, une série de transformations (rigides, linéaires et non linéaires) dans l'espace ont été appliquées sur les images structurelles et fonctionnelles, afin de toutes les ramener dans un espace commun pour pouvoir les comparer entre elles.

Suite à ce prétraitement, les données ont été analysées en trois étapes : 1) Séparation des données individuelles post-injection en 5 sous-sessions de 5 minutes (T1 à T4) ; 2) Pour chaque sous-session de chaque individu, calcul statistique des voxels montrant une différence significative en signal BOLD, par rapport à la ligne de base (T0, donnée préinjection) ; 3) Analyses statistiques de groupe. Analyse statistique between-subject, pour chaque sous-session, des différences d'activation entre chaque de chacune des conditions d'administration de cocaïne (4, 8 ou 12 mg/kg) et le groupe contrôle (0 mg/kg).

## **Animaux**

L'échantillon expérimental se compose de 16 souris femelles adultes de souche C57BL/6J (JANVIER, Le-Genest-Saint-Isle, France) âgées de 7 semaines et pesant entre 17 et 19 grammes, réparties équitablement (N = 4) entre quatre groupes correspondant aux quatre conditions expérimentales d'administration (0, 4, 8 et 12 mg/kg).

Rappelons qu'il s'agit ici d'une étude préliminaire de faisabilité. Par conséquent, il n'était pas nécessaire de mobiliser un échantillon de grande taille, ceci justifiant le manque de puissance statistique relatif à la présente étude. De plus, l'étude a été réalisée en deux vagues. Elle a d'abord été réalisée sur 8 sujets (deux sujets par groupe) afin d'obtenir des premiers résultats et de mettre au point la méthodologie d'analyse. Ensuite, l'échantillon a été renforcé de deux individus supplémentaires par groupe, afin d'augmenter la puissance statistique.

Le choix de la souche a été motivé par le désir de s'inscrire dans la continuité du projet de recherche initié par Lespine et Tirelli (2015).

Durant période précédant l'expérience, toutes les souris ont été hébergées par groupes de quatre, avec accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. La pièce dans laquelle les animaux ont été hébergés était soumise à un cycle jour/nuit de 12h et maintenue à une température ambiante d'environ 22°C.

Toutes les manipulations ont été réalisées conformément aux directives éthiques européennes (Directive 2010/63/EU du 22 septembre 2010 sur la protection des animaux utilisés à fin d'expérimentations) et belges (Arrêté Royal du 23 mai 2013 relatif à la protection des animaux d'expérience) en vigueur, et avec l'autorisation de la Commission d'éthique animale de l'Université de Liège.

## **Administration de cocaïne**

Comme décrit précédemment, les souris ont été réparties en quatre conditions d'injection de substance. Trois groupes ont respectivement été soumis à une injection de 4, 8 ou 12 mg/kg d'hydrochlorure de cocaïne (BELGOPIA, Louvain-La-Neuve, Belgique) dilué dans un soluté salin (0,9% NaCl) pour une concentration de 1mg/ml. Le quatrième groupe aura servi de groupe contrôle et a simplement subi une injection de 8 ml/kg de solution saline (0,9% NaCl).

Les doses administrées ont été sélectionnées sur base d'expériences menées précédemment, montrant l'existence d'un effet dose-dépendant de la cocaïne sur le comportement locomoteur de la souris (Michel & Tirelli, 2002). Tandis que les effets hyperkinésiques n'apparaissent qu'à partir de 5mg/kg, seules des doses supérieures à 10 mg/kg induisent significativement plus de stéréotypies. Ainsi, nous avons sélectionné des doses correspondant aux différents effets locomoteurs observables (Aucun, Hyperkinésie et Stéréotypies) pour pouvoir observer les éventuelles différences d'activation cérébrale entre ces trois conditions.

L'injection a été faite par voie intrapéritonéale, directement à l'intérieur du scanner IRM, par l'intermédiaire d'un cathéter en plastique. La route d'injection a, de nouveau, été choisie par souci de cohérence avec les expériences menées précédemment (Lespine & Tirelli, 2015).

## Anesthésie

Les contraintes indissociables des acquisitions IRM (contention du corps et de la tête, bruits du scanner, cathétérisation...) génèrent beaucoup de stress chez les animaux. Ce stress pouvant interférer avec les résultats, il est nécessaire de les anesthésier pour la durée de l'expérience.

Dans le cadre de cette étude, le protocole d'anesthésie de base sur des travaux réalisés par Grandjean, Schroeter, Batata et Rudin (2014). Ceux-ci ont étudié l'effet de différentes doses d'anesthésiants, sur les résultats obtenus en imagerie fonctionnelle. Ils ont pu observer qu'une perturbation minimale du signal cérébral, notamment dans le cortex frontal, était assurée par l'utilisation conjointe d'une faible dose d'isoflurane et de médétomidine. Les conclusions tirées de ces travaux ont été complétées avec celles de Adamczak, Farr, Seehafer, Kalthoff et Hoehn (2010), évaluant les doses optimales de médétomidine à utiliser.

Ainsi, nous avons pu mettre en place un protocole anesthésique limitant au maximum l'impact sur le phénomène hémodynamique.

L'anesthésie est d'abord induite en plaçant les animaux dans une boîte hermétique, dont l'atmosphère est progressivement saturée par un mélange gazeux oxygène-isoflurane (5 %). Une fois les souris endormies, le pourcentage est réduit à 2% et un bolus de 0,4 mg/kg de médétomidine est injecté par voie sous-cutanée. Cinq minutes après l'injection du bolus, l'isoflurane est progressivement réduit à 0,75% et une infusion de 0,8 mg/kg/h de médétomidine commence à être administrée, afin d'assurer la stabilité de l'anesthésie au long de l'expérience. Cette perfusion est continuée tout du long à l'aide d'un pousse-seringue relié à un cathéter de plusieurs mètres de long.

Afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'anesthésie, plusieurs fonctions physiologiques ont été contrôlées pendant l'entièreté de l'expérience.

Premièrement, afin de contrer la baisse de température corporelle provoquée, les cellules de contention étaient munies d'une fonction chauffante, permettant le maintien de la température ambiante à 38°C. La température corporelle a également été contrôlée à l'aide d'une sonde anale (Starr Life Sciences Corp., USA).

Deuxièmement, la fréquence respiratoire était monitorée grâce à un coussin de pression installé

au fond de la cellule (Minerve, France). Son observation permet non seulement de s'assurer de l'état de sédation, mais aussi de vérifier la bonne injection de la cocaïne. En effet, celle-ci provoque une augmentation du rythme respiratoire facilement observable.

Finalement, un système LED d'oxymétrie (Starr Life Sciences Corp., USA) a été attaché à la patte des souris, afin de pouvoir mesurer la saturation sanguine en oxygène. Étant donné que le signal acquis en IRM fonctionnelle est directement lié, il était impératif de s'assurer de la stabilité de cet aspect du fonctionnement hémodynamique.

## **Acquisitions IRM**

Toutes les données ont été acquises In Vivo sur un scanner IRM 9.4T (9.4T/310 ASA ; Agilent, USA), par l'intermédiaire d'une antenne de surface (Rapid Biomedical GmbH) placée au-dessus de la tête des individus.

Les acquisitions IRM ont été faites en deux étapes successives. Tout d'abord, une séquence de SE-EPI (Spin Echo Echo Planar Imaging) a été lancée afin d'obtenir une image fonctionnelle des variations du signal BOLD à l'intérieur de la cavité crânienne. Les paramètres utilisés pour cette séquence sont les suivants : [TR : 2500 ms ; TE : 19 ms ; FoV : 35x35 mm ; Matrice : 96x96 ; Nbr de tranches : 12 ; Épaisseur des tranches : 0,5 mm ; Interstice : 0,2 mm ; Average : 1 ; ESP : 0,584 ms ; ETL : 72], pour une durée totale de scan d'environ 30 minutes. Nous avons donc un champ de vue qui fait 35x35x8 mm. Celui-ci ne couvre donc pas l'entièreté de la boîte crânienne, mais est manuellement centré sur les régions mésocorticolimbiques, afin de permettre la visualisation de toutes les zones cérébrales impactée par la consommation aigue de cocaïne.

L'injection de l'hydrochlorure de cocaïne (ou de soluté salin) s'effectue 10 minutes après le début de cette séquence. Ceci permet d'obtenir 10 minutes de ligne de base et d'observer In Vivo l'évolution des variations en signal BOLD pendant les 20 minutes successives à l'administration.

Une fois l'acquisition fonctionnelle terminée, une séquence 2D Fast-Spin Echo (TR : 3000 ms ; TE : 40 ms ; FoV : 35x35 ; Matrice : 256x256 ; Nbr de tranches : 12 ; Épaisseur des tranches : 0,5 mm ; Interstice : 0,2 mm ; Average : 3 ; ESP : 10 ms ; Segments/ETL : 32/8), d'une durée de 20 minutes, a été lancée afin d'obtenir une image structurelle du cerveau des souris.

Afin d'éviter tout mouvement de tête des individus lors des acquisitions, ceux-ci ont été placés dans une cellule de contention munie d'un système de contention par barres d'oreilles et barre de gueule (Minerve, FR).

La qualité des acquisitions IRMf a été contrôlée à l'aide d'une extension SPM développée in-lab. Il s'agit d'une analyse de stabilité de la séquence IRM. Celle-ci a été réalisée sur les données d'acquisition d'un fantôme, un petit tube rempli de gel faisant approximativement la taille d'une souris.

## **Traitement des données – Prétraitement**

Avant de pouvoir lancer les analyses statistiques, il est nécessaire d'opérer une série de transformations sur les images IRM brutes. Cette étape du processus, appelée 'prétraitement', a pour fonction de corriger toute une série de problèmes inhérents au processus IRM (Febo, 2013 ; Pan, Billings, Grooms, Shakil & Keilholz, 2015). Toutes les transformations mentionnées ci-dessous ont été réalisées à l'aide du logiciel 'Statistical Parametric Mapping' (SPM8, v8.7), un software tournant sur la plateforme MATLAB (R2013a, v8.1.0.604). Toutes les manipulations faites avec SPM8 l'ont été en utilisant les préréglages 'mouse-C57', fournis avec l'outil 'SPMMouse' (v.1.1.b ; Sawiak et al., 2009).

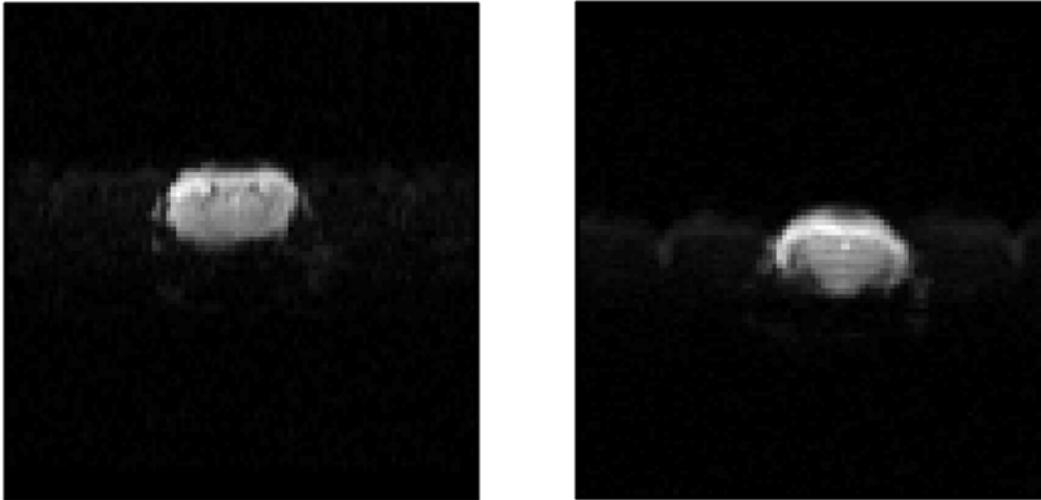
Un premier problème vient de la durée de scans. Chaque acquisition fonctionnelle dure approximativement 31 minutes. Il est donc inévitable que les souris bougent légèrement dans leur cellule pendant cette durée, que ce soit dû à de soubresauts musculaires ou, plus simplement, à un mouvement respiratoire. Ces mouvements créent de légers décalages spatiaux entre les différents volumes acquis. Bien qu'ils soient très petits (jusqu'à 0,4 mm), ils sont source d'imprécision lors des analyses statistiques finales.

Ce problème peut facilement être corrigé avec la fonction 'Realign' de SPM8, un outil qui va automatiquement réaligner tous les volumes d'une session sur le premier.

Un second problème vient de la manière même d'encoder les données IRM. En effet, lorsqu'une image IRMf est acquise, l'entièreté du volume n'est pas acquise en même temps. L'encodage se fait de manière séquentielle, une coupe à la fois. Dans notre cas, par exemple, le volume est acquis en 12 tranches de 0,5 mm d'épaisseur, dans un ordre antérieur-postérieur. Ce type d'encodage présente un énorme défaut. Il crée un décalage de plusieurs secondes entre l'acquisition de la première et de la dernière tranche (dans notre cas, 2.5 secondes). Inutile de préciser qu'un tel écart réduit drastiquement la résolution temporelle de nos données.

Par conséquent, la première correction à apporter s'appelle le 'slice-timing correction'. Il s'agit de transformer un peu le signal BOLD pour ramener le signal de chaque tranche dans la zone temporelle de la tranche centrale (ici, la sixième), par interpolation temporelle. Cette correction peut être effectuée à l'aide de la fonction 'Slice Timing' de SPM8.

Le dernier problème est observable lorsqu'on compare les images des différents individus entre elles. On peut, effectivement, observer un décalage spatial systématique entre les images, ainsi que de différences individuelles en taille ou en orientation (*Fig. 5*). Ces différences ont deux origines, à commencer par l'expérimentateur lui-même. En effet, lorsque l'on place les souris dans leurs cellules de contention ou, ensuite, dans le scanner, il est impossible de les mettre toutes exactement dans la même position. Certaines auront la tête penchée légèrement vers la gauche, seront un peu plus loin à l'intérieur du scanner... Ce problème peut être facilement résolu à l'aide de l'outil 'Reorient Image' de SPM8. Celui-ci permet de redéfinir manuellement l'origine des images (le point '0 0 0' de l'espace) et de modifier leur orientation dans l'espace, par une série de transformations sur six paramètres (3 translations et 3 rotations). Ceci permet de modifier les images pour toutes les superposer les unes aux autres. Notons que cette méthode reste assez imprécise. C'est pourquoi il faut également affiner cette superposition à l'aide d'outils automatiques, tels que l'option 'Realign' de SPM8. C'est ce que nous avons fait ici. Toutes les transformations ont été appliquées à la fois sur les images fonctionnelles et sur leurs images structurelles associées.



*Fig. 7* – Exemple de coupes IRMf ‘brutes’ prises à l’origine, pour deux individus différents. On peut observer un décalage entre leurs positions et orientations.

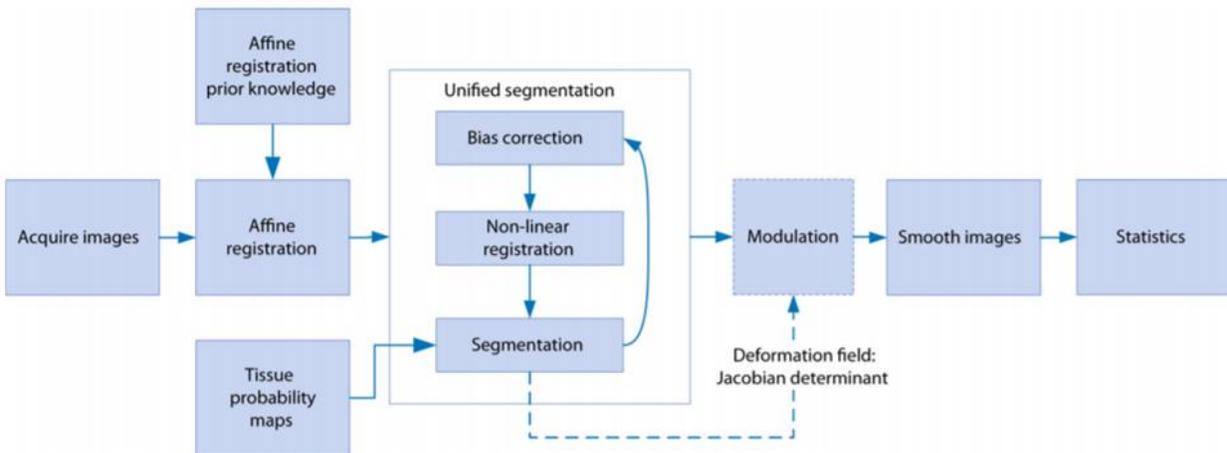
Une seconde cause de différences est tout simplement la variabilité morphologique des individus. Le cerveau n’a pas toujours exactement la même taille, ou encore la même position dans la boîte crânienne. De même, les structures internes n’ont pas toujours les mêmes dimensions. Plusieurs algorithmes sont disponibles dans SPM8 pour régler ce type de problèmes. Dans la présente étude, notre choix s’est porté sur la méthode ‘Diffeomorphic Registration using Exponentiated Lie Algebra’ (DARTEL) de John Ashburner (2007). Il s’agit d’un algorithme sophistiqué permettant de normaliser de manière précise des images IRM entre elles, en passant par la normalisation individuelle de chacun des différents types de tissus cérébraux. De plus, cet algorithme replace tous les sujets dans l’espace Paxinos (Franklin & Paxinos, 2008).

La normalisation avec DARTEL fonctionne en trois étapes (*Fig. 6*) : la segmentation des images, la normalisation des cartes de répartition tissulaire et l’application des paramètres de transformation aux images fonctionnelles. La première de ces étapes est essentielle. En effet, il est d’abord nécessaire de connaître la répartition des différents tissus, dans chacune des images. Il s’agit donc, avant toute chose, d’appliquer un algorithme de segmentation (de ‘séparation en différents tissus’) sur ces dernières.

L'algorithme qui a été choisi est celui fourni avec SPM8 et lancé grâce à la commande 'Pre-proc : segment'. Il utilise des cartes dites d'*a priori*, afin d'effectuer la segmentation des images. Il s'agit de cartes rendant compte de la répartition probable des différents types de tissus, chez nos individus. Dans cette étude, une segmentation en trois classes de tissus (matière grise, matière blanche et fluide céphalo-rachidien) a été demandée à partir des cartes fournies par défaut avec SPMMouse (Sawiak et al., 2009). Les paramètres utilisés lors de cette segmentation étaient ceux fournis par défaut avec SPMMouse, à la seule différence que, dans le cas présent, une modulation et une normalisation des cartes de tissus sorties ont été exigées.

Une fois les cartes segmentées obtenues, elles ont été transférées à DARTEL grâce à la fonction 'Initial Import' de SPM8. Cette fonction permet de calibrer un certain nombre de paramètres. Si la plupart ont été conservés comme tels, deux ont tout de même été modifiés. Premièrement, il a été demandé que DARTEL crée des cartes de probabilité présentant des dimensions de voxels similaires à celles des images originelles. Cette requête s'est faite par la modification du paramètre 'Voxel Size' en 'NaN'. Deuxièmement, l'option 'CSF' a été placée sur 'YES', afin d'obtenir des cartes de probabilités pour le fluide céphalo-rachidien, en plus de celles pour la matière grise et la matière blanche.

Ceci fait, la seconde étape peut commencer. Il s'agit de la création d'une image moyenne de la répartition des différents tissus de notre échantillon, en utilisant DARTEL. Il s'agit d'un algorithme itératif, qui vise à trouver la superposition optimale possible entre toutes les images, en leur appliquant individuellement une série de transformations dites 'difféomorphiques'. Ces transformations se présentent sous forme de matrices de déterminants Jacobiens, ou encore 'champs de déformation'. Pour simplifier, DARTEL va appliquer une série de transformations non linéaires sur les images segmentées, afin de les normaliser les unes aux autres. Ensuite, il va effectuer une moyenne des images transformées, pour chaque type de tissus, afin d'obtenir une image représentative de l'ensemble de la population. Cette étape a été réalisée à l'aide de la fonction 'DARTEL : Create template', de SPM8.



*Fig. 8* – Schéma représentant le fonctionnement de la normalisation avec DARTEL. Premièrement, les images sont coregistrées à un template préexistant. Ensuite, elles sont segmentées et les images représentatives de chaque tissu sont normalisées entre elles de manière optimale, par processus itératif. Finalement, les transformations sont appliquées aux images d’origine (Sawiak et al., 2014).

Une fois les images normalisées, il suffit de récupérer les paramètres de transformation et de les appliquer à chacune des images, afin de toutes les obtenir dans le même espace.

Attention, il est important de préciser qu’un tel algorithme ne peut pas être utilisé directement sur les images fonctionnelles. En effet, celles-ci ne permettent pas d’être segmentées, leur faible résolution ne permettant pas de bien distinguer les différents types de tissus. C’est pour cette raison qu’il a été nécessaire d’acquérir des images structurales. Ce sont elles qui ont été utilisées avec DARTEL, pour pouvoir ensuite appliquer les transformations calculées sur les images fonctionnelles, afin de toutes les placer dans le même espace.

La dernière étape de notre prétraitement consiste à lisser les images en utilisant un kernel gaussien de ‘Full Width at Half Maximum’ (FWHM) équivalent à 0,8 mm. Cette valeur a été choisie, car il est conseillé de la limiter à deux à trois fois la taille de voxel des images (ici, ~0,35 mm). Ce lissage agit comme un filtre en re-répartissant le signal de chaque voxel sur les voxels adjacents, par moyennage gaussien. Ceci permet d’augmenter légèrement le rapport signal-bruit, et d’ainsi diminuer l’impact parasitaire que les pics trop importants d’intensité pourraient avoir sur l’analyse de données.

Une fois le prétraitement terminé, les images sont prêtes à être analysées.

## Traitement des données – Analyses statistiques

L'analyse statistique des données a également été entièrement réalisée à l'aide du logiciel SPM8, selon la méthode dite de 'pseudo-block', largement utilisée et référencée dans le domaine des études phMRI (McKie et al., 2005 ; Schwarz, Whitcher, Gozzi, Reese & Bifone, 2006 ; Dodd, William & Luckman, 2010 ; Becker et al., 2016 ; Taheri, Xun, See, Joseph & Reichel, 2016). Celle-ci utilise l'approche du modèle linéaire généralisé (GLM) pour analyser les variations en signal BOLD (time series) au fil des volumes. Ce type d'analyse se fait de manière massivement univariée, c'est-à-dire qu'elle est effectuée individuellement pour chaque voxel. Le modèle utilise les valeurs de signal BOLD comme variable dépendante et la condition expérimentale comme régresseur. Cette analyse se fait sur deux niveaux.

Le premier niveau est intra-individuel (within-subject). Il permet d'estimer dans quelle mesure les variations observées du signal BOLD au cours du temps sont expliquées par la condition expérimentale, dans notre cas, l'injection de cocaïne. Afin de pouvoir investiguer le déroulement temporel de l'action de la cocaïne, les auteurs cités précédemment suggèrent de diviser la durée en plusieurs segments (variant 2 à 7 minutes) et d'effectuer une régression sur chacun d'eux. Dans cette étude, le signal successif à l'injection (20 minutes) a été divisé en quatre segments de 5 minutes (T1 à T4). Chacun de ceux-ci a fait l'objet d'une régression par rapport à la baseline (10 minutes). De cette manière, quatre cartes de contraste (t-values) ont été créées pour chaque individu, rendant compte de l'effet de l'injection de cocaïne sur les variations BOLD de chaque voxel, et ce pour chaque segment temporel.

Le second niveau est interindividuel (between-subject). Ici, une ANOVA factorielle 4x4 (Dose x Temps) est réalisée voxel par voxel sur les cartes de contrastes obtenues lors des analyses de premier niveau. Ceci permettra d'évaluer trois choses : l'effet principal de la dose sur le signal BOLD, l'effet principal du temps et l'interaction entre la dose et le temps. Ensuite, des comparaisons multiples sont effectuées entre chaque condition cocaïne (4, 8 et 12 mg/kg) et la condition saline, et ce pour chaque segment temporel (T1 à T4). Ainsi, 12 cartes de probabilités seront créées, permettant de visualiser les zones cérébrales dont le signal BOLD varie

significativement ( $p < 0,001$ , non corrigé) suite à une injection de 4, 8 ou 12 mg/kg de cocaïne, à différents moments succédant l'injection.

L'analyse sera effectuée deux fois, afin d'évaluer séparément la significativité des augmentations et des diminutions en signal BOLD.

# **Présentation des résultats**



## **Anesthésie et stabilité des fonctions physiologiques**

Trois fonctions physiologiques ont été relevées dans le cadre de cette étude. Premièrement, le rythme respiratoire. Celui-ci se stabilisait en moyenne à 120 respirations par minutes, 10 minutes après l'injection du bolus de médétomidine. Après injection de cocaïne, cette fréquence augmentait en moyenne de 20 respirations par minutes pour les doses de 8 et 12 mg/kg. Deuxièmement, la température corporelle mesurée à l'aide de la sonde annale référençait une température de  $36,6 \pm 0,2^\circ$ . Celle-ci demeurait constante chez tous les individus. Finalement, l'appareil d'oxymétrie référence un taux de saturation moyen de  $96,2 \pm 0,9\%$ . Une donnée a dû être exclue des analyses, car elle présentait un taux d'oxygénation de 86%.

Nous n'avons souffert aucun réveil d'animal pendant les expériences et toutes les fonctions physiologiques montraient une bonne stabilité.

## **Qualité de l'acquisition IRMf**

L'analyse de stabilité de la séquence IRMf sur fantôme a montré trois choses (*Fig. 9*). Premièrement, Il y a très peu de mouvement spontané du signal à l'intérieur du scanner. Celui-ci est inférieur à 0,05 millimètres. Deuxièmement, le signal dérive très peu. On ne relève que 0,8% de différence d'intensité entre le premier et le dernier volume. De plus, aucune perte de signal n'a été observée au cours des répétitions. Finalement, la troisième analyse montre qu'il y a très peu de fluctuations dans le signal BOLD relevé, seulement 0,37% en moyenne

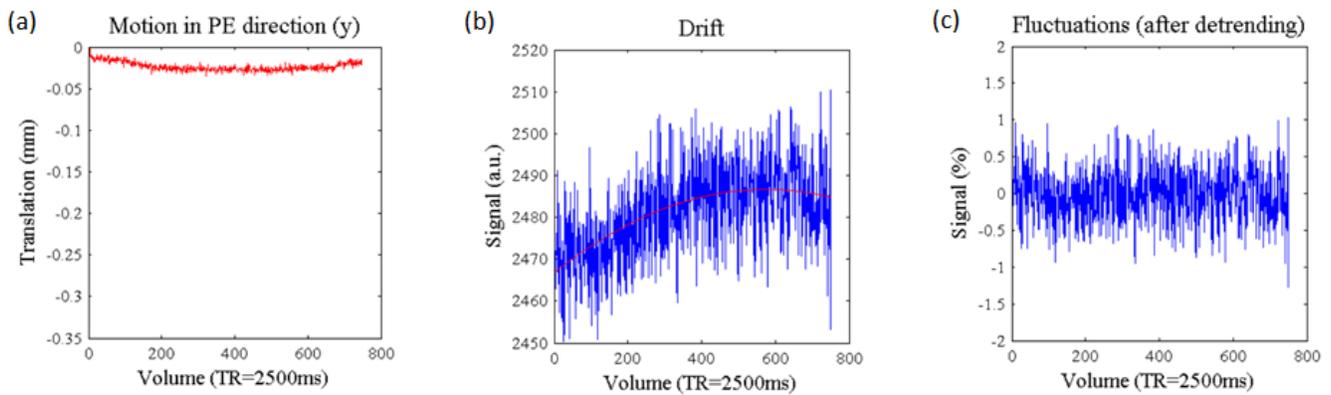


Fig. 9 – Résultats de l'analyse de stabilité de la séquence IRMF. (a) Les mouvements longitudinaux globaux du signal (mm) pour chaque volume. (b) Déviation du signal (Hz). (c) Changement relatif du signal global à chaque nouveau volume (%).

Lors de l'analyse visuelle des images IRMF (Fig. 10), nous avons pu observer que celles-ci sont de bonne qualité. Le contour du cerveau est bien délimité et il est possible de distinguer facilement les plus grosses structures. De plus, les données ne présentent que très peu d'artéfacts. Néanmoins, elles présentent tout de même quelques défauts. Nous pouvons notamment observer une perte de signal systématique au niveau des parties frontales de l'hémisphère gauche et dans les parties ventrales.

Les images structurales, quant à elles, sont de très bonne qualité et ne présentent aucun artéfact.

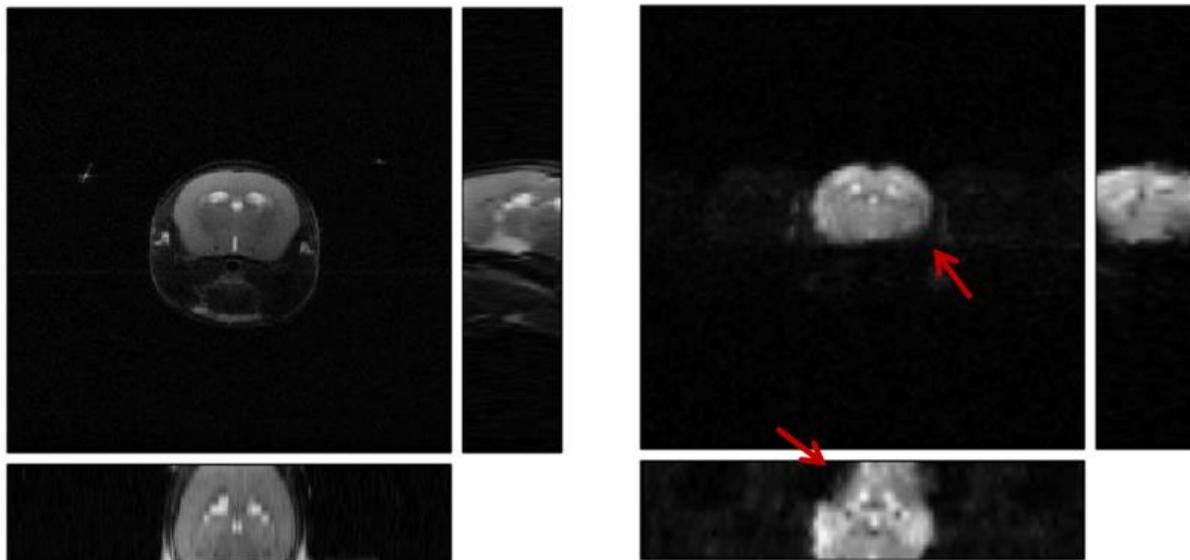


Fig. 10 – Comparaison d'une image structurale (gauche) et fonctionnelle (droite). Les images s'agencent ainsi. Milieu : vue coronale ; Droite : vue sagittale ; Bas : vue axiale. Les images fonctionnelles sont de suffisamment bonne qualité pour permettre la distinction des grosses structures (ex : les ventricules cérébraux, l'hippocampe ...). On peut également observer des pertes de signal au niveau ventral et frontal (flèche rouge).

## Prétraitement des images

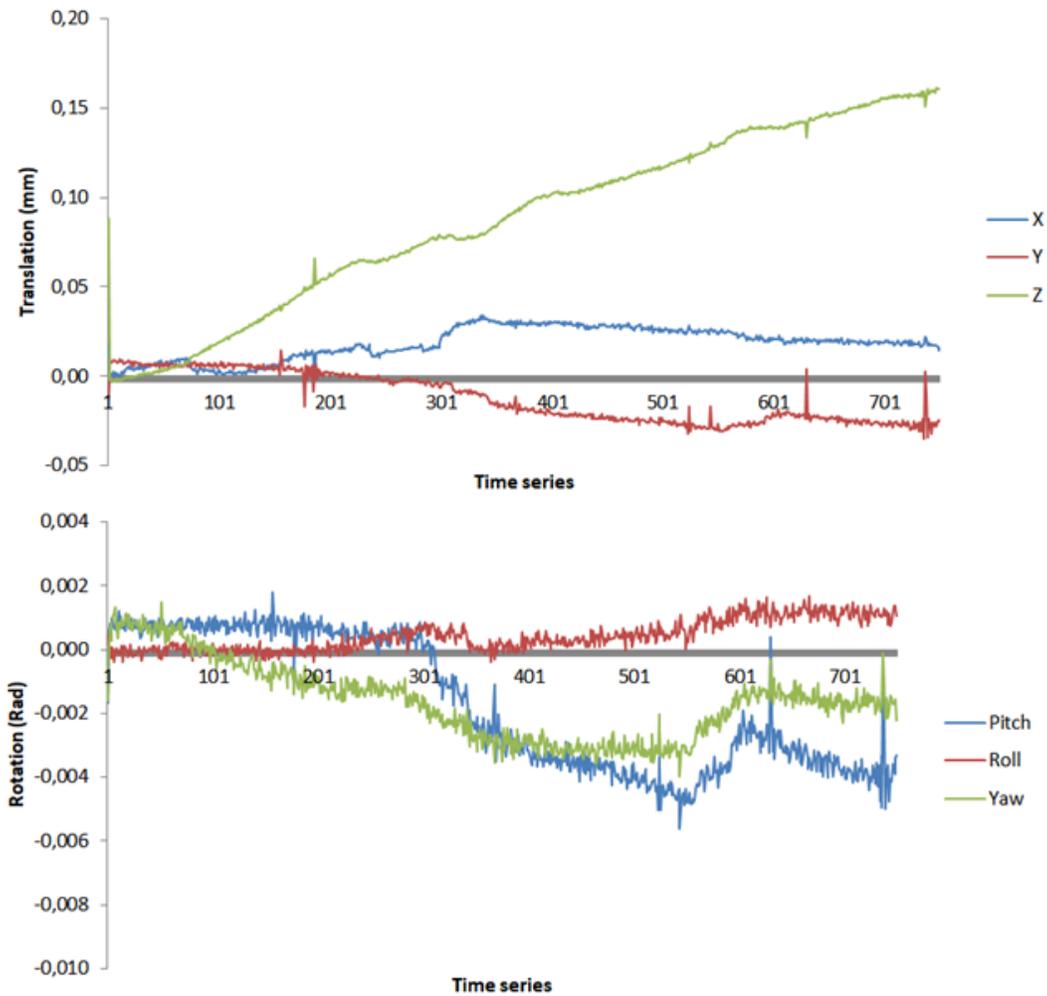
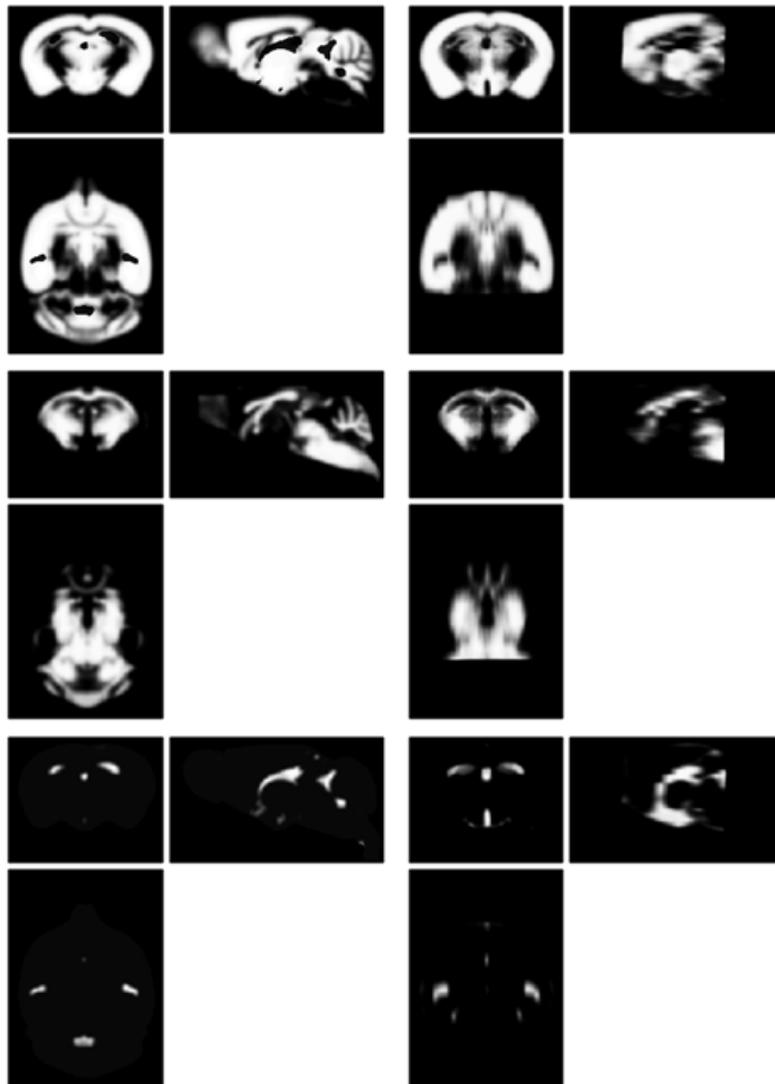


Fig. 11 – Résumé des paramètres de translation dans les 6 dimensions de l'espace effectuées durant l'étape de réalignement du prétraitement d'images. En haut : Moyenne des paramètres de translation individuels pour chaque volume. En bas : Moyenne des paramètres de rotation individuels sur l'axe x (Pitch), y (Roll) et z (Yaw) pour chaque volume.

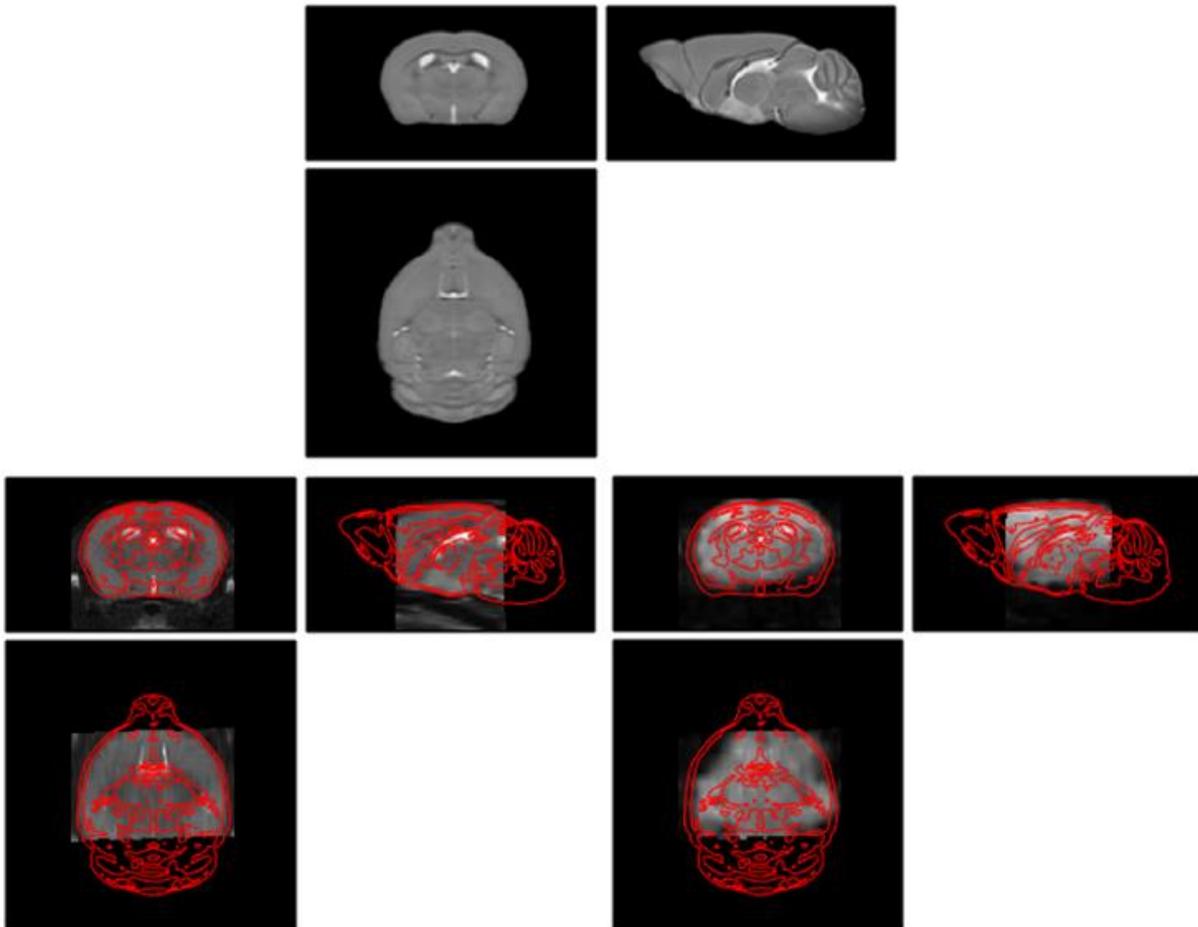
Ci-dessus, une représentation schématique des transformations moyennes effectuées dans chaque dimension de l'espace, pour chacun des 750 volumes, lors de l'étape de réaligement des images (*Fig. 11*). Pour rappel, il s'agit d'une étape qui consistait à réaligner tous les volumes d'une même session sur le premier, afin de les superposer. On peut y remarquer que les décalages moyens effectués sont assez faibles, avec une translation maximum de 0,16 mm effectuée sur l'axe Y pour le 750<sup>ème</sup> volume et une rotation maximum de -0,0056 radians effectuée sur l'axe x pour le volume 545. De plus, on peut observer que les dériviatives du signal se font de manière graduelle. Il n'y a que très peu de pics ou de variations brusques. Bien que les résultats montrés ici représentent une moyenne interindividuelle, ils reflètent parfaitement la tendance générale au sein de l'échantillon.

La qualité de la segmentation avec Dartel a été évaluée par observation de l'image moyenne normalisée calculée pour chaque type de tissus (*Fig. 12*). Celles-ci ont été comparées visuellement aux cartes de probabilités de référence fournies avec SPMmouse. On peut observer que les deux sont très similaires. Bien que l'image moyenne de notre échantillon soit légèrement plus floue que celle de référence, les tissus ont été correctement classés et la frontière entre eux est nettement tracée. Néanmoins, un défaut peut être observé sur le résultat correspondant au CSF. Il présente énormément de tissus excédentaires au niveau ventral.

A la fin du prétraitement, la bonne normalisation des images individuelles au template de référence a été évaluée par superposition de ce dernier aux données structurelles et fonctionnelles (*Fig. 13*). Celle-ci a été effectuée avec succès pour chacune des images. Les images se situent dans le même espace et les structures se superposent parfaitement.



*Fig. 12* – A gauche : les cartes de probabilités fournies avec SPMmouse. A droite : les images moyennes normalisée des résultats individuels de la segmentation avec Dartel. De haut en bas : carte des répartitions de matière grise, matière blanche et fluide cérébrospinal.



*Fig. 13* – Superposition du template (haut) sur une image structurelle (gauche) et une image fonctionnelle normalisée (droite). On peut observer que toutes les images sont bien dans le même espace.

## Résultats des analyses statistiques

Nous avons mentionné précédemment que la présente recherche avait été effectuée en deux vagues. Par conséquent, les analyses statistiques ont été effectuées à deux reprises, une première fois avec deux individus par groupes et une seconde avec quatre. Malheureusement, si la première a fonctionné et a montré toute une série de résultats significatifs, la seconde n'a absolument rien donné. Par conséquent, une seule série de résultats sera présentée ici, tandis que la perte de significativité sera questionnée dans le prochain chapitre ('Interprétation et discussion').

Les résultats seront abordés en quatre étapes. Premièrement, nous adresserons la question des effets principaux et d'interaction. Ensuite, les résultats des comparaisons multiples relatifs aux trois conditions d'injection seront présentés un à un.

Si les analyses n'ont pas montré d'effet principal du temps ou d'interaction 'dose x temps', elles ont tout de même mis en évidence un effet principal de la substance sur l'augmentation du signal BOLD cérébral. Celui-ci est significatif ( $p < 0,001$ , non corrigé) dans le cortex moteur primaire droit, le striatum gauche, l'hippocampe, le cortex somatosensoriel primaire droit et les aires visuelles secondaires droites (*Fig. 14*).

Les comparaisons multiples n'ont, quant à elles, montré de résultats que pour l'augmentation de signal BOLD. Le test T entre la condition saline et la condition 4 mg/kg met en évidence une augmentation significative ( $p < 0,001$ , non corrigé) du signal dans le cortex moteur primaire droit, le striatum bilatéral pour les chaque segment temporel. De plus, une activation significative ( $p < 0,001$ , non corrigé) est relevée dans le septum, le thalamus, le cortex visuel primaire droit et le cortex somatosensoriel primaire droit aux temps T3 et T4. On peut également observer une augmentation du signal ( $p < 0,001$ , non corrigé) dans l'hippocampe au temps T1. Notons que le cluster situé au niveau des aires visuelles est beaucoup plus gros que les autres (*Fig. 15*).

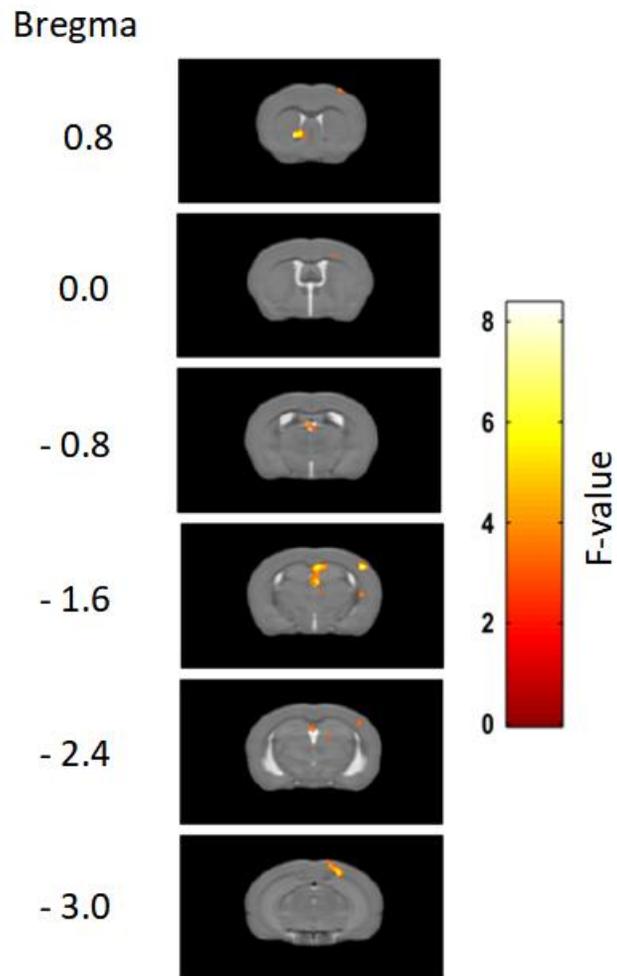


Fig. 14 – Carte statistique (f-scores) correspondant à l'effet principal de la dose.

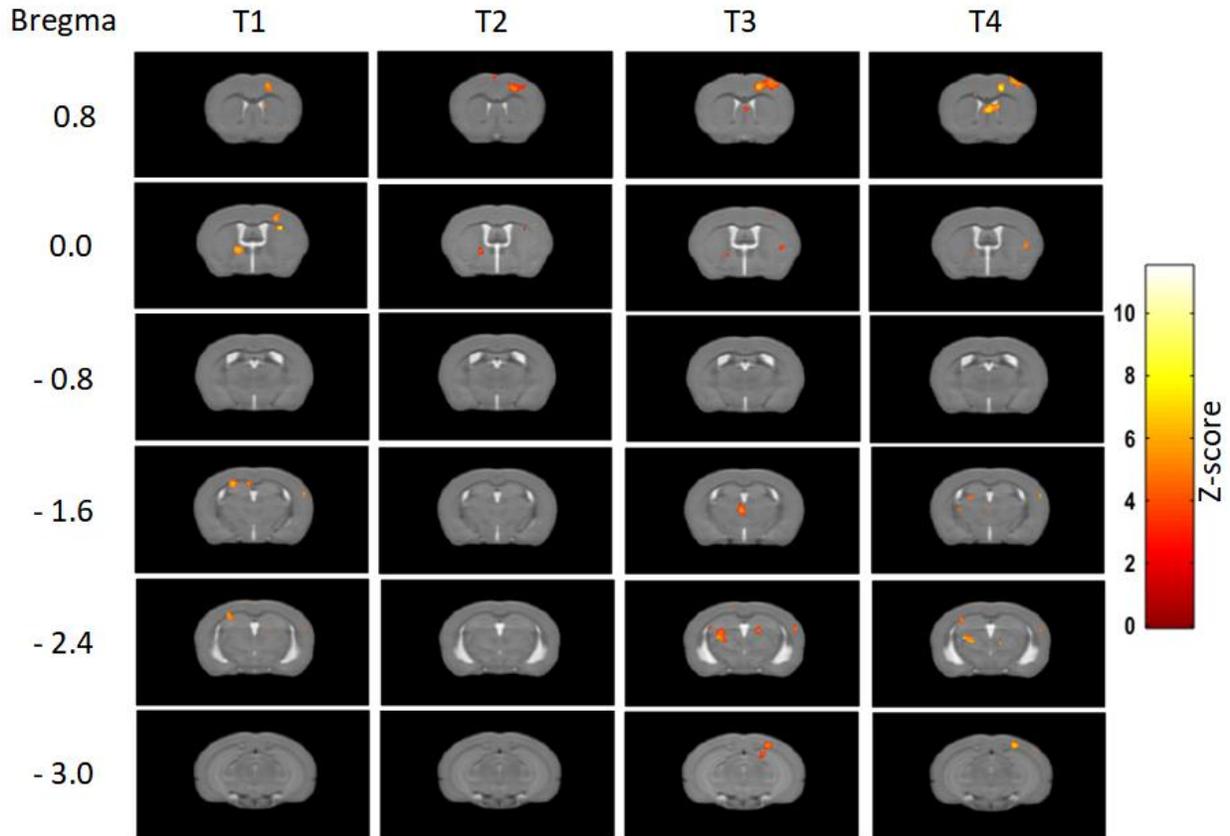


Fig. 15 – Carte statistiques (z-scores) correspondant à la comparaison, aux différents temps, entre la condition saline et la condition 4 mg.

Le test T effectué pour la condition 8 mg/kg montre des résultats similaires. Une augmentation significative ( $p < 0.001$ , non corrigé) du signal par rapport à la condition saline a été trouvée pour tous les segments temporel dans le cortex moteur primaire droit, le septum, l'hippocampe bilatéral et le cortex somatosensoriel primaire droit. On relève également une augmentation significativement ( $p < 0.001$ , non corrigé) plus importante dans le thalamus, au temps T2 à T4. On peut également voir un petit cluster d'activation significative ( $p < 0.001$ , non corrigé) dans les aires somatosensorielles secondaires droites (Fig. 16).

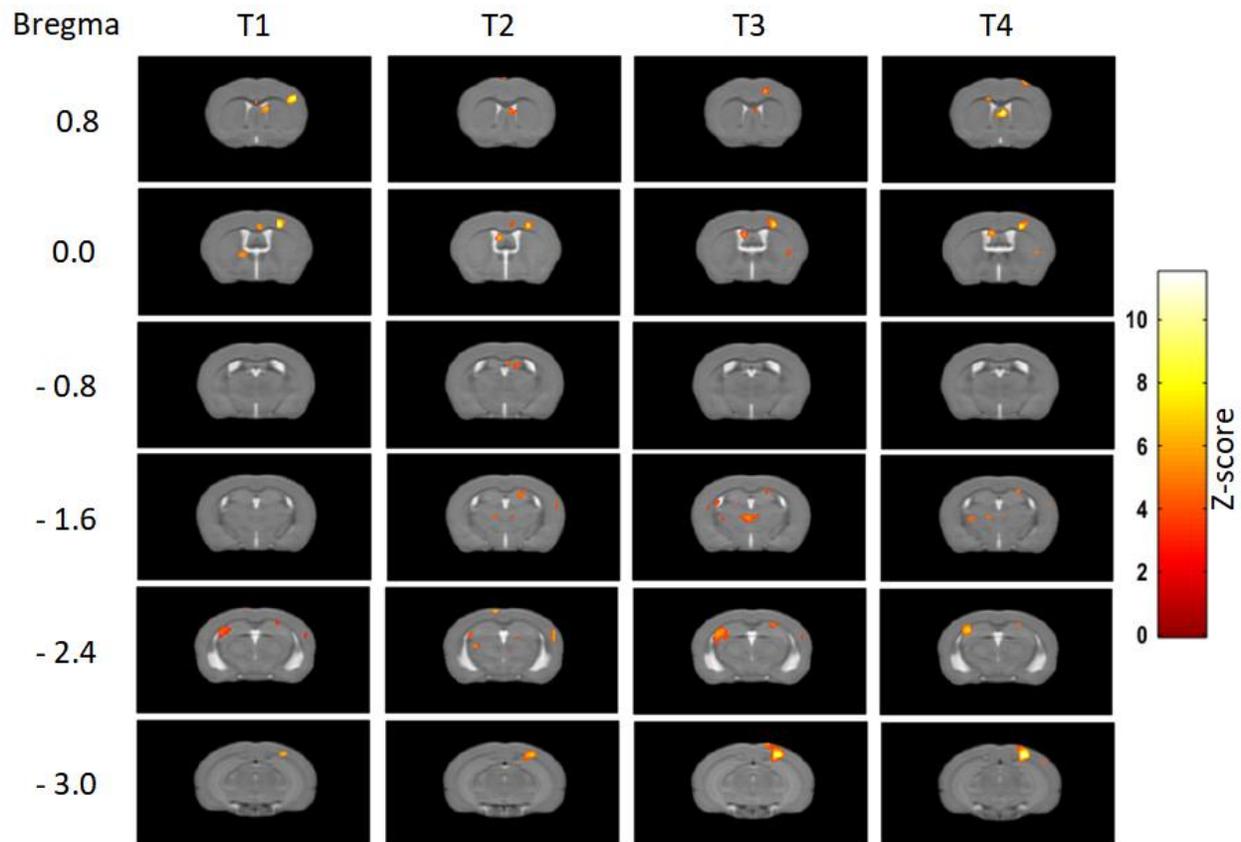
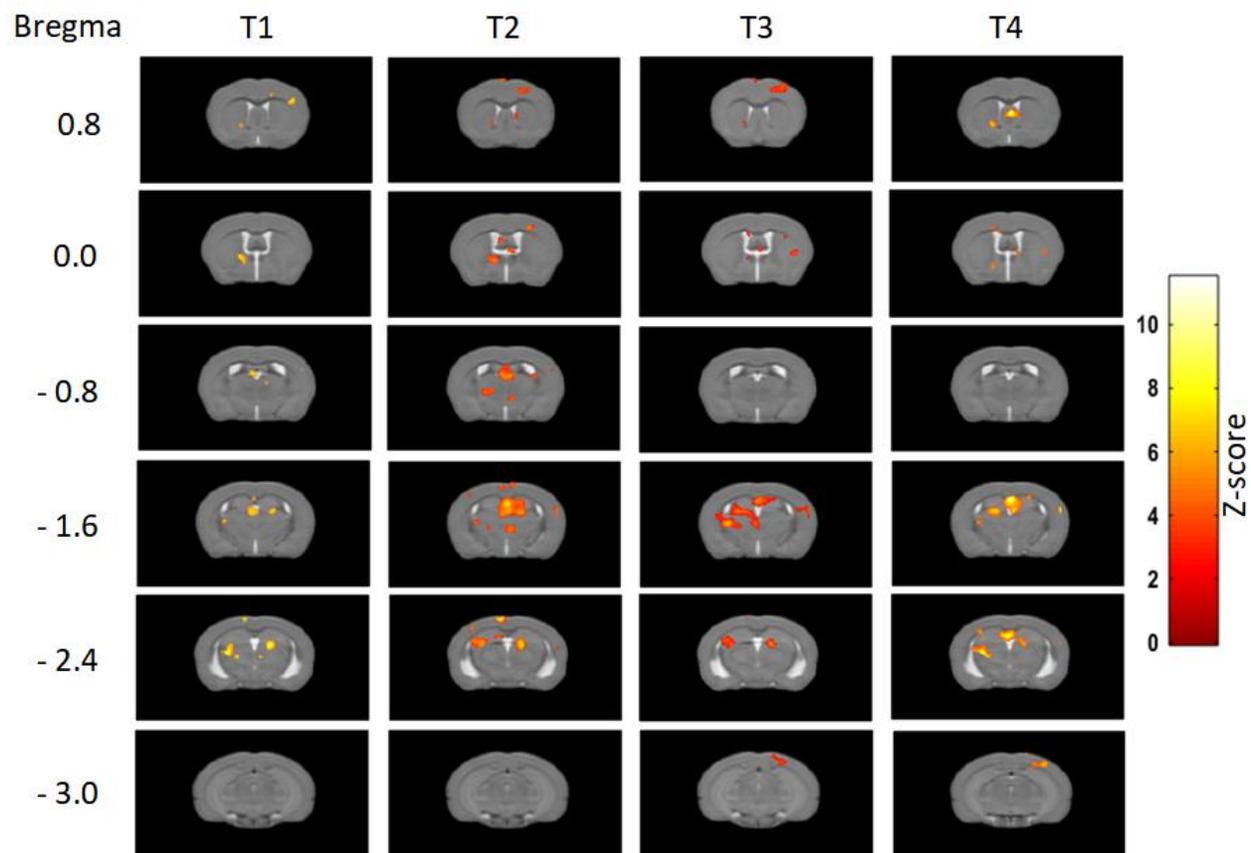


Fig. 15 – Carte statistiques (z-scores) correspondant à la comparaison, aux différents temps, entre la condition saline et la condition 8 mg.

En ce qui concerne la comparaison entre la condition saline et 12 mg/kg, le test statistique a montré une augmentation significativement ( $p < 0,001$ , non corrigé) plus importante du signal BOLD dans le cortex moteur primaire droit, le septum, le striatum bilatéral, le thalamus et l'hippocampe bilatéral pour toutes les séquences temporelles. De plus, on peut observer une augmentation significative ( $p < 0,001$ , non corrigé) du signal dans les cortex somatosensoriels primaires et secondaires droits aux temps T2, T3 et T4 (Fig. 17). Notons que les clusters relevés lors de cette analyse sont beaucoup plus étendus que pour les comparaisons de la condition saline avec les conditions 8 mg/kg et 12 mg/kg.



*Fig. 16* – Carte statistiques (z-scores) correspondant à la comparaison, aux différents temps, entre la condition saline et la condition 12 mg.



# **Interprétation et discussion**



## **Anesthésie et stabilité des fonctions physiologiques**

Les relevés des fonctions physiologiques entrent dans les standards attendus. D'une part, la fréquence respiratoire se stabilise aux environs de 120 respirations par minutes, ce qui est cohérent avec les études précédemment réalisées avec un tel régime anesthésique (Adamczak et al., 2010 ; Niranjan, Christie, Solomon, Wells, Lythgoe, 2016). D'autre part, si on peut observer une petite hypothermie chez les souris, celle-ci reste très faible et est inhérente à l'utilisation des anesthésiants. En ce qui concerne le taux d'oxygénation du sang, il est largement dans les limites prescrites par le manuel du logiciel MouseOx (entre 95 et 97%).

La stabilité de tous ces paramètres permet de conclure que le protocole anesthésique fonctionne bien. De plus, les augmentations systématiques de la fréquence respiratoire suite à l'administration de cocaïne assurent qu'elle a bien été injectée et assimilée par les individus. Nous pouvons donc en déduire que le protocole de perfusion est fonctionnel.

## **Qualité de l'acquisition IRMf**

Les analyses de stabilité auront permis de démontrer le bon fonctionnement de la séquence IRMf. Quel que soit le paramètre étudié, on observe très peu de variation sur la durée. D'une part, les mouvements spontanés du signal s'observent sur des distances inférieures à 0,05 mm, ce qui représente environ 15% de la taille d'un voxel. On peut donc estimer qu'ils sont négligeables au vu de notre résolution d'image. D'autre part, les fluctuations spontanées du signal BOLD enregistré sont bien en deçà des usuels quelques pourcents de variation de signal mentionnés dans la littérature (Friedman & Glover, 2006 ; Mandeville et al., 2014). On peut donc espérer que ces fluctuations auront une influence minimale sur les données relevées. De manière plus générale, les paramètres relevés entrent dans les recommandations mentionnées dans la littérature (Friedman & Glover, 2006).

L'analyse visuelle des images acquises confirme l'adéquation de la séquence. Elles sont de bonne qualité et permettent la distinction des structures. Néanmoins, le souci de perte de signal dans les aires frontales est problématique. Il s'agit là d'un problème dit de 'warping', ou artefact de repliement. Celui-ci est fréquemment rencontré lorsque le champ de vue de l'acquisition ne comprend pas l'intégralité du tissu, ce qui est notre cas dans la présente étude. Si un tel phénomène peut être facilement contournable en agrandissant le champ de vue des acquisitions, ceci impliquerait d'augmenter le nombre de coupes acquises, sous peine de perdre énormément de résolution spatiale. Cette méthode aurait pour conséquence d'augmenter drastiquement le temps d'acquisition des images. Une autre solution consisterait à utiliser une séquence en encodage de phase inversé (Kastler & Vetter, 2018). Néanmoins, ceci impliquerait un remaniement complet de la séquence IRMf. Par ailleurs, de tels types d'artéfacts peuvent également être causés par des inhomogénéités du champ magnétique, phénomène particulièrement présent dans les images acquises avec des scanners puissants (et donc sensibles) (Cusack, Brett & Osswald, 2003 ; Cardoso et al., 2018). D'autres techniques existent pour régler ce type de problème. Elles impliquent principalement l'utilisation de cartes de champ magnétique, rendant compte des inhomogénéités de champs observables pendant la durée des scans (Cusack, Brett & Osswald, 2003). Malheureusement, ces dernières doivent être acquises en même temps que les données.

En résumé, si des solutions existent à ce problème, elles sont très coûteuses en temps et en savoir-faire méthodologique. Par conséquent, elles sont difficiles à imaginer dans le cadre du présent mémoire. Il restera néanmoins indispensable de les considérer lors de la préparation de futures études.

## **Prétraitement des images**

Les résultats obtenus lors du réalignement des images nous apportent une information essentielle quant à l'efficacité de l'anesthésie et de la contention des animaux. En effet, si l'animal venait à se réveiller, il tenterait de se débattre. Ceci se traduirait dans les données par une série de pics successifs. De plus, si la tête n'était pas parfaitement immobilisée, on pourrait observer de grandes variations dans la position de la tête au fil des volumes. Étant donné que dans le cas présent les variations sont assez restreintes et que très peu de pics sont observables, il est fort probable que l'anesthésie ait fonctionné parfaitement.

Globalement, l'analyse visuelle d'images finales est concluante. L'algorithme DARTEL a bien fonctionné et a permis une superposition parfaite de toutes les images à l'espace Paxinos. Bien que l'on ait pu observer un léger flou d'image sur les résultats moyens de la segmentation, celui-ci est tout à fait normal lorsque la normalisation se fait sur un petit nombre de sujets (Ashburner, 2007). La classification de tissus excédentaire observable sur l'image du CSF n'est, quant à elle, pas très inquiétante. Il s'agit simplement de tissus extracérébral.

## **Résultats des analyses statistiques**

Les résultats de la première vague de sujets ont offert des résultats très intéressants, malgré le nombre restreint de sujets. Revenons tout d'abord sur les hypothèses qui avaient été formulées avant de commencer la recherche. Le postulat était double. Premièrement, nous avons prédit une augmentation plus importante du signal BOLD dans les aires mésocorticolimbiques par rapport à la condition saline, notamment dans les aires impliquées dans le système de la récompense. Deuxièmement, nous nous étions interrogés sur l'existence d'un effet dose-dépendant de cette action.

Les résultats de la première analyse vont dans le sens de cette hypothèse. En effet, on observe bien une augmentation plus importante du signal BOLD dans le septum, le thalamus, le striatum

et l'hippocampe, toutes des aires faisant l'objet d'afférences de la part de l'ATV (Meyer & Quenzer, 2005). Mais plus surprenant, nous avons également observé une augmentation de l'activation dans les cortex visuels et moteurs primaires, ainsi que dans le système somesthésique. L'effet de la cocaïne sur le cortex moteur primaire a déjà été relevé dans une étude sur les individus cocaïnomanes (Hanlon, Wesley, Roth, Miller, & Porrino, 2010). Ceci est probablement dû au fait que cette aire cérébrale reçoit également des afférences dopaminergiques de la part de l'AVT (Hosp, Pekanovic, Rioult-Pedotti & Luft, 2011). L'augmentation d'activation dans les aires visuelles, à l'inverse, pose plus de questions. En effet, cette région n'est pas connue pour posséder des récepteurs dopaminergiques. Cependant, au même titre qu'une grande partie des aires sensorielles, elle reçoit des informations monoaminergiques, notamment sérotoninergiques, en abondance (Jacob & Nienborg, 2018). Or, il se trouve que la cocaïne est un bloqueur de la recapture de ce neurotransmetteur. Les activations dans le cortex somatosensoriel étaient, quant à elles, attendues. En effet, cet effet avait déjà été mis en avance chez le rat par Febo et al. (2005). La seconde partie de notre hypothèse évoquait la présence d'un effet dose-dépendant de la réaction du signal BOLD à la cocaïne. Les résultats de l'analyse factorielle ont montré la présence d'un tel effet, le calcul de l'effet principal de la dose injectée étant significatif à une valeur  $p$  inférieure à 0,001 (non-corrigé). De plus, l'analyse du nombre de pixels significatifs nous montre que les clusters sont bien plus étendus dans la condition 12 mg/kg que dans les deux autres. En revanche, nous n'avons pas pu montrer l'existence d'un effet du temps sur l'évolution du signal.

Une observation, plus générale, peut être formulée après visualisation des résultats. On peut voir que, quelle que soit la condition, ce sont globalement les mêmes aires cérébrales qui montrent des différences d'activation. Même si les conclusions statistiques ne peuvent pas être tirées avec confiance, au vu de la taille de notre échantillon, on peut espérer que cet effet reflète bien un impact de la cocaïne dans ces régions. En effet, si la coïncidence est possible, il semble peu probable que l'injection d'un même produit, à des concentrations différentes produise exactement les mêmes effets par hasard. Si cette conclusion n'est pas très rigoureuse d'un point de vue scientifique, elle semble fondée dans le cadre d'une étude préliminaire. En effet, cette connaissance pourrait donner des pistes à investiguer lors de prochaines études, notamment en terme de définition de régions d'intérêt pour les analyses.

Malheureusement, la seconde vague d'analyse n'aura pas aidé à étayer ces résultats. En effet, après ajout des nouvelles données collectées, tous les effets significatifs ont disparu. Ce problème peut avoir plusieurs causes. Premièrement, le simple effet de hasard. En effet, cet événement pourrait bien être un parfait exemple des problèmes posés par l'utilisation d'un faible échantillon de données. En effet, petit échantillon est synonyme de faible puissance statistique et donc de risques accrus d'erreur de type 2. En effet, à faible puissance, on ne peut que détecter de grandes tailles d'effet (Krzywinski & Altman, 2013). Il serait donc opportun, à l'avenir de recruter plus de sujets. Le nombre minimum d'individus recommandé dans la littérature varie de 12 à 25 par groupe, en fonction du plan expérimental (Desmond & Glover, 2002).

Deuxièmement, les doses injectées de cocaïne mentionnées dans la littérature sont bien plus importantes que celles utilisées ici. La plupart sont de l'ordre des 30 mg/kg (Perles-Barbacaru et al., 2011 ; Perles-Barbacaru et al., 2012). Bien que, dans le cadre de cette étude, les quantités administrées étaient bien plus faibles afin de pouvoir établir la relation entre un éventuel effet dose-dépendant sur l'activité cérébrale et celui observé sur le comportement, il pourrait être intéressant d'observer les effets de doses plus importantes. De plus, cela pourrait contribuer à augmenter la taille d'effet.

Une autre possibilité de ce manque de résultat pourrait venir du fait que l'échantillon est entièrement composé de souris femelles. En effet, certaines études suggèrent que la réactivité du système dopaminergique diffère selon les concentrations en estradiol sanguin. De ce fait, il verrait son activité basale augmentée pendant les phases d'œstrus (Calipari et al., 2016). Cet effet sur les valeurs en signal BOLD a été montré par Febo, Ferris et Segarra (2005). Dans le cadre de notre étude, les phases de reproduction des femelles n'ont pas été prises en compte. Par conséquent, il est possible que plusieurs individus aient été en oestrus pendant les premières phases acquisition, ce qui aurait pu augmenter les valeurs de signal BOLD récoltées. A l'avenir, il serait judicieux de vérifier ce paramètre.

Finalement, il est important de prendre en compte les problèmes de 'warping' mentionnés précédemment. Ceux-ci compromettent largement l'analyse du signal en provoquant divers artefacts dans le données, telles que délocalisation, de pertes ou des superpositions du signal (Cardoso et al., 2018). Ils constituent d'ailleurs la principale hypothèse concernant la raison de la perte de significativité dans nos résultats. En effet, on en retrouve sur toutes les images. Il est

également possible que les déformations aient été plus importantes pendant le deuxième de scans. De fait, ces déformations sont normalement minimisées par ‘shimming’, un processus permettant d’éliminer les inhomogénéités du champ magnétique de l’IRM. Or, il se trouve que celui-ci était légèrement dysfonctionnel juste avant la seconde phase d’acquisitions. Nous avons d’ailleurs dû faire venir la maintenance. Il est possible que les problèmes aient légèrement persisté après. Quoiqu’il en soit, il serait nécessaire, à l’avenir, d’intégrer une séquence d’acquisition des cartes de champs magnétiques au protocole d’acquisition afin de pouvoir résoudre le problème s’il se reproduit.

# **Conclusion et perspectives**

Malgré la perte de significativité de résultats expérimentée suite à l'ajout d'une deuxième vague de données, les résultats de cette étude sont plutôt satisfaisants. En effet, même si nous n'avons pas pu tirer de conclusions solides quant à l'effet dose dépendant d'une injection de cocaïne sur les variations en signal BOLD chez la souris C57Bl/6 femelle, nous avons pu mettre à l'épreuve notre protocole en situation expérimentale. Ceci nous aura, entre autres permis d'adopter un point de vue critique sur les données récoltées et la méthodologie employée et d'en tirer plusieurs conclusions.

Premièrement, nous avons pu mettre en évidence la capacité du laboratoire à acquérir des images fonctionnelles de cerveau de rongeurs à l'aide d'un scanner à haut champ magnétique. Si l'on met de côté les artefacts de repliement, la qualité des images est très bonne, comparativement à ce que l'on peut observer dans la littérature sur le sujet.

Deuxièmement, nous avons pu déterminer que le protocole d'anesthésie est parfaitement fonctionnel et adéquat. En effet, nous n'avons eu à déplorer aucun réveil, ni d'instabilité dans les fonctions physiologiques. De même, les résultats du réalignement d'images auront montré que les déplacements des animaux au sein du scanner sont minimales. De plus, les appareils de contrôle des fonctions vitales ont très bien fonctionné.

Troisièmement, nous avons pu tester la méthode de traitement d'image sur des données réelles, prélevées dans les laboratoires de l'Université de Liège. Ceci aura permis de vérifier le bon fonctionnement des différentes extensions utilisées et de vérifier qu'elles étaient bien adaptées au type d'images utilisé. En somme, les résultats du prétraitement se sont montrés satisfaisants, avec des résultats de segmentations et de normalisations d'images plus que corrects, au vu du faible nombre d'individus utilisés et de la faible résolution des images récoltées.

Finalement, son test en situation expérimentale aura permis de dégager une série de défauts dans la conception de notre protocole expérimental. Son test aura permis de mettre en lumière plusieurs problèmes à résoudre impérativement ou certaines considérations à prendre en compte lors de futures études.

En résumé, si les résultats ne sont pas satisfaisant d'un point de vue expérimental, ils le sont tout à fait dans le cadre d'une étude préliminaire. De fait, ils auront permis d'obtenir une bonne vision d'ensemble du problème étudié et de dégager une série d'améliorations à apporter au protocole afin de minimiser les risques de plantage lors des expériences définitives.



# **Bibliographie**



- Adamczak, J. M., Farr, T. D., Seehafer, J. U., Kalthoff, D., & Hoehn, M. (2010). High field BOLD response to forepaw stimulation in the mouse. *NeuroImage*, *51*(2), 704-712.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.083>
- Ashburner, J. (2007). A fast diffeomorphic image registration algorithm. *NeuroImage*, *38*(1), 95-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.07.007>
- Becker, G., Bolbos, R., Costes, N., Redouté, J., Newman-Tancredi, A., & Zimmer, L. (2016). Selective serotonin 5-HT1A receptor biased agonists elicit distinct brain activation patterns: a pharmacMRI study. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep26633>
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2016). Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *American Psychologist*, *71*(8), 670-679. <https://doi.org/10.1037/amp0000059>
- Borges, A. C., Duarte, R. B. M., Nogueira, L., & Barros, M. (2015). Temporal and dose-dependent differences in simultaneously-induced cocaine hypervigilance and conditioned-place-preference in marmoset monkeys. *Drug and Alcohol Dependence*, *148*, 188-194.  
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.01.007>
- Calipari, E. S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D. M., Cahill, M. E., Ribeiro, E., ... Nestler, E. J. (2017). Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nature Communications*, *8*, 13877. <https://doi.org/10.1038/ncomms13877>
- Cusack, R., Brett, M., & Osswald, K. (2003). An Evaluation of the Use of Magnetic Field Maps to Undistort Echo-Planar Images. *NeuroImage*, *18*(1), 127-142.  
<https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1281>
- Desmond, J. E., & Glover, G. H. (2002). Estimating sample size in functional MRI (fMRI) neuroimaging studies: Statistical power analyses. *Journal of Neuroscience Methods*, *118*(2), 115-128. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00121-8)

- Dodd, G. T., Williams, S. R., & Luckman, S. M. (2010). Functional magnetic resonance imaging and c-Fos mapping in rats following a glucoprivic dose of 2-deoxy-d-glucose. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06671.x>
- Febo, M. (2005a). Estrogen Influences Cocaine-Induced Blood Oxygen Level-Dependent Signal Changes in Female Rats. *Journal of Neuroscience*, 25(5), 1132-1136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3801-04.2005>
- Febo, M. (2005b). Estrogen Influences Cocaine-Induced Blood Oxygen Level-Dependent Signal Changes in Female Rats. *Journal of Neuroscience*, 25(5), 1132-1136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3801-04.2005>
- Febo, Marcelo. (2011). Technical and Conceptual Considerations for Performing and Interpreting Functional MRI Studies in Awake Rats. *Frontiers in Psychiatry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00043>
- Febo, Marcelo. (2013). Functional Magnetic Resonance Imaging in Awake Rats: Studies Relevant to Addiction and the Reward Circuitry. In N. M. Avena (Éd.), *Animal Models of Eating Disorders* (Vol. 74, p. 351-374). Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-104-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-104-2_21)
- Friedman, L., & Glover, G. H. (2006). Report on a multicenter fMRI quality assurance protocol. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 23(6), 827-839. <https://doi.org/10.1002/jmri.20583>
- Glover, G. H. (2011). Overview of Functional Magnetic Resonance Imaging. *Neurosurgery Clinics of North America*, 22(2), 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2010.11.001>
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C., & Burda, A. M. (2009). Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Disease-a-Month*, 55(1), 6-38. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.10.002>

- Grandjean, J., Schroeter, A., Batata, I., & Rudin, M. (2014). Optimization of anesthesia protocol for resting-state fMRI in mice based on differential effects of anesthetics on functional connectivity patterns. *NeuroImage*, *102*, 838-847. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.08.043>
- Haensel, J. X., Spain, A., & Martin, C. (2015). A systematic review of physiological methods in rodent pharmacological MRI studies. *Psychopharmacology*, *232*(3), 489-499. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3855-0>
- Hanlon, C. A., Wesley, M. J., Roth, A. J., Miller, M. D., & Porrino, L. J. (2010). Loss of laterality in chronic cocaine users: An fMRI investigation of sensorimotor control. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, *181*(1), 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.07.009>
- Hosp, J. A., Pekanovic, A., Rioult-Pedotti, M. S., & Luft, A. R. (2011). Dopaminergic Projections from Midbrain to Primary Motor Cortex Mediate Motor Skill Learning. *Journal of Neuroscience*, *31*(7), 2481-2487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5411-10.2011>
- Howell, L. L., & Cunningham, K. A. (2014). Serotonin 5-HT<sub>2</sub> Receptor Interactions with Dopamine Function: Implications for Therapeutics in Cocaine Use Disorder. *Pharmacological Reviews*, *67*(1), 176-197. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009514>
- Iris Chen, Y., Famous, K., Xu, H., Choi, J.-K., Mandeville, J. B., Schmidt, H. D., ... Jenkins, B. G. (2011). Cocaine self-administration leads to alterations in temporal responses to cocaine challenge in limbic and motor circuitry: Pharmacologic MRI of Cocaine SA. *European Journal of Neuroscience*, *34*(5), 800-815. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07806.x>
- Jacob, S. N., & Nienborg, H. (2018). Monoaminergic Neuromodulation of Sensory Processing. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00051>
- Jenkins, B. G. (2012). Pharmacologic magnetic resonance imaging (phMRI): Imaging drug action in the brain. *NeuroImage*, *62*(2), 1072-1085. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.075>

- Jonckers, E., Shah, D., Hamaide, J., Verhoye, M., & Van der Linden, A. (2015). The power of using functional fMRI on small rodents to study brain pharmacology and disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00231>
- Kastler, B. (2011). *Comprendre l'IRM manuel d'auto-apprentissage*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson. Consulté à l'adresse <http://www.sciencedirect.com/science/book/9782294710445>
- Krzywinski, M., & Altman, N. (2013). Power and sample size: Points of significance. *Nature Methods*, 10(12), 1139-1140. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2738>
- Kufahl, P. R., Rowe, D. B., & Li, S.-J. (2007). Processing the acute cocaine fMRI response in human brain with Bayesian source separation. *Digital Signal Processing*, 17(5), 965-978. <https://doi.org/10.1016/j.dsp.2007.03.001>
- Lespine, L.-F., & Tirelli, E. (2015). The protective effects of free wheel-running against cocaine psychomotor sensitization persist after exercise cessation in C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 310, 650-664. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.009>
- Lima Cardoso, P., Dymerska, B., Bachratá, B., Fischmeister, F. P. S., Mahr, N., Matt, E., ... Robinson, S. D. (2018). The clinical relevance of distortion correction in presurgical fMRI at 7 T. *NeuroImage*, 168, 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.12.070>
- Lu, H., Chefer, S., Kurup, P. K., Guillem, K., Vaupel, D. B., Ross, T. J., ... Stein, E. A. (2012). fMRI response in the medial prefrontal cortex predicts cocaine but not sucrose self-administration history. *NeuroImage*, 62(3), 1857-1866. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.05.076>
- Luo, F., Schmidt, K. F., Fox, G. B., & Ferris, C. F. (2009). Differential responses in CBF and CBV to cocaine as measured by fMRI: Implications for pharmacological MRI signals derived oxygen metabolism assessment. *Journal of Psychiatric Research*, 43(12), 1018-1024. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.11.009>

- Luo, F., Wu, G., Li, Z., & Li, S.-J. (2003). Characterization of effects of mean arterial blood pressure induced by cocaine and cocaine methiodide on BOLD signals in rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49(2), 264-270. <https://doi.org/10.1002/mrm.10366>
- Mandeville, J. B., Liu, C. H., Vanduffel, W., Marota, J. J. A., & Jenkins, B. G. (2014). Data collection and analysis strategies for pHMRI. *Neuropharmacology*, 84, 65-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.018>
- Marota, J. J. A., Mandeville, J. B., Weisskoff, R. M., Moskowitz, M. A., Rosen, B. R., & Kosofsky, B. E. (2000). Cocaine Activation Discriminates Dopaminergic Projections by Temporal Response: An fMRI Study in Rat. *NeuroImage*, 11(1), 13-23. <https://doi.org/10.1006/nimg.1999.0520>
- McKie, S., Del-Ben, C., Elliott, R., Williams, S., del Vai, N., Anderson, I., & Deakin, J. F. W. (2005). Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacofMRI. *Psychopharmacology*, 180(4), 680-686. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2270-y>
- Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: drugs, the brain, and behavior*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Publishers.
- Michel, A., & Tirelli, E. (2002). Conditioned hyperkinesia induced by cocaine in mice is dose-dependent but not correlated with the unconditioned response or the contextually-sensitized response: *Behavioural Pharmacology*, 13(1), 59-71. <https://doi.org/10.1097/00008877-200202000-00006>
- Niranjan, A., Christie, I. N., Solomon, S. G., Wells, J. A., & Lythgoe, M. F. (2016). fMRI mapping of the visual system in the mouse brain with interleaved snapshot GE-EPI. *NeuroImage*, 139, 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.06.015>
- Pan, W.-J., Billings, J. C. W., Grooms, J. K., Shakil, S., & Keilholz, S. D. (2015). Considerations for resting state functional MRI and functional connectivity studies in rodents. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00269>

- Perles-Barbacaru, T.-A., Procissi, D., Demyanenko, A. V., Hall, F. S., Uhl, G. R., & Jacobs, R. E. (2011). Quantitative pharmacologic MRI: Mapping the cerebral blood volume response to cocaine in dopamine transporter knockout mice. *NeuroImage*, *55*(2), 622-628.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.12.048>
- Perles-Barbacaru, T.-A., Procissi, D., Demyanenko, A. V., & Jacobs, R. E. (2012). Quantitative pharmacologic MRI in mice: QUANTITATIVE PHARMACOLOGIC MRI IN MICE. *NMR in Biomedicine*, *25*(4), 498-505. <https://doi.org/10.1002/nbm.1760>
- Potvin, S., Stavro, K., Rizkallah, É., & Pelletier, J. (2014). Cocaine and Cognition: A Systematic Quantitative Review. *Journal of Addiction Medicine*, *8*(5), 368-376.  
<https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000066>
- Rapport européen sur les drogues. Tendances et évolutions. 2017. (s. d.), 96.
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470-485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>
- Sawiak, S.J., Wood, N. I., Williams, G. B., Morton, A. J., & Carpenter, T. A. (2009). Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. *Neurobiology of Disease*, *33*(1), 20-27.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.09.016>
- Sawiak, Stephen J., Picq, J.-L., & Dhenain, M. (2014). Voxel-based morphometry analyses of in vivo MRI in the aging mouse lemur primate. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *6*.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00082>
- Shanti, C. M., & Lucas, C. E. (2003). Cocaine and the critical care challenge: *Critical Care Medicine*, *31*(6), 1851-1859. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000063258.68159.71>
- Sora, I., Hall, F. S., Andrews, A. M., Itokawa, M., Li, X.-F., Wei, H.-B., ... Uhl, G. R. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter

knockouts eliminate cocaine place preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 5300-5305. <https://doi.org/10.1073/pnas.091039298>

Spronk, D. B., van Wel, J. H. P., Ramaekers, J. G., & Verkes, R. J. (2013). Characterizing the cognitive effects of cocaine: A comprehensive review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1838-1859. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.003>

Taheri, S., Xun, Z., See, R. E., Joseph, J. E., & Reichel, C. M. (2016). Cocaine and methamphetamine induce opposing changes in BOLD signal response in rats. *Brain Research*, 1642, 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.040>

## **Résumé du mémoire**

Concernant seize pourcent des demandes de traitement pour addiction, la problématique de l'addiction à la cocaïne est et reste un défi considérable en matière de santé publique. Largement connue pour son potentiel addictif élevé et sa propension à induire des complications cardiaques sévères, il reste encore difficile à ce jour d'avoir une vision globale précise de ses effets aigus sur le fonctionnement cérébral. Néanmoins, l'essor grandissant des techniques modernes d'imagerie médicale pourrait bien renverser la balance.

Le projet de cette étude est de développer un protocole expérimental permettant l'évaluation in vivo de l'impact de la cocaïne sur l'activité cérébrale, à l'aide de la technique d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle. Pour ce faire, nous avons posé les jalons d'une méthode d'investigation du signal BOLD et l'avons testée en situation expérimentale réelle. Ainsi, un échantillon expérimental réduit de souris femelles C57Bl6 s'est vu administrer de cocaïne selon quatre conditions de dosage différentes : 0, 4, 8 ou 12 mg/kg. Nous hypothétisons alors pouvoir observer une augmentation dose-dépendante du signal BOLD cérébral successivement à une administration aiguë de cocaïne.

Si la méthodologie d'acquisition et de traitement de signal s'est avouée très concluante, il n'en va pas de même pour l'analyse statistique. Alors qu'une première vague de tests et d'analyse offrait des résultats très intéressants, l'ajout successif de données à l'échantillon a vu disparaître toute significativité au sein des résultats. Malheureusement, étant indépendant de la méthodologie d'analyse utilisée, ce problème n'a pas pu être résolu.

Néanmoins, cette étude nous aura permis de mettre à l'épreuve notre protocole en situation expérimentale. Ceci nous aura, entre autres permis d'adopter un point de vue critique sur les données récoltées et la méthodologie employée et de dégager une série d'améliorations à y apporter.